

LUPE FURTADO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA BUTIRILCOLINESTERASE E
OBESIDADE**

Tese de Doutorado apresentada ao
curso de Pós Graduação em
Genética da Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor.
Orientadora: Profa. Dra. Eleidi A.
Chautard Freire Maia.

CURITIBA

2005

“Esta liberdade de duvidar é uma questão importante em ciência e, creio, também noutros campos. Nasceu de uma luta. Foi uma luta ser permitido duvidar, não ter certezas. Não queria que esquecêssemos a importância dessa luta e, como consequência, que a abandonássemos. Sinto uma grande responsabilidade enquanto cientista que sabe do grande valor de uma filosofia da ignorância e do progresso que essa filosofia tornou possível, progresso esse que é fruto da liberdade de pensamento. Sinto a responsabilidade de proclamar o valor dessa liberdade e de ensinar que não devemos temer a dúvida, mas antes devemos acolhê-la como a possibilidade de um novo potencial para os seres humanos. Se sabemos que não temos a certeza, temos a possibilidade de melhorar a situação. Quero exigir esta liberdade para as gerações futuras.” (Richard Feynman).

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Professora Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia, pela minha educação científica e por me ensinar a procurar e a gostar de buscar.

Ao Professor Dr. Ricardo Lethonen Rodrigues de Souza, que me ensinou muito e que sempre foi competente, entusiasmado e solidário, minha mais profunda gratidão.

Obrigada a todos os colegas do laboratório e do Departamento de Genética, pela ajuda, pelas conversas, pelo dia-a-dia e por todo o trabalho e dedicação na produção de conhecimento científico.

Obrigada aos russos que *crackearam* os cartuchos das impressoras da *Epson*.

Agradeço, também, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FUNPAR pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

Agradeço aos Céus e à Terra pelo João e pelo Benn, luzes da minha alma.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 COLINESTERASES	2
2.2 ESTRUTURA BIOQUÍMICA DA BChE HUMANA.....	8
2.3 GENE <i>BCHE</i>	12
2.4 LOCO <i>CHE2</i>	15
2.5 VARIABILIDADE DO GENE <i>BCHE</i>	18
2.6 BChE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO IMC	23
2.7 OBESIDADE: DEFINIÇÕES, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS	31
2.8 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE.....	36
2.9 GENÉTICA DA OBESIDADE	39
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL.....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 AMOSTRA.....	49
4.2 METODOLOGIA.....	53
4.2.1 Aspectos Gerais	53
4.2.2 Medida de atividade da BChE.....	53

4.2.3 Eletroforese em gel de ágar – Fenotipagem do loco <i>CHE2</i>	54
4.2.4 Extração do DNA (<i>Lahiri e Nurnberger, 1991</i>).....	55
4.2.5 PCR-SSCA	55
4.2.6 Sequenciamento	64
4.2.7 Análise Estatística.....	65
5 RESULTADOS	66
5.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	66
5.1.1 Amostra total de doadores de sangue	66
5.1.2. Amostra de obesos utilizada nesse estudo.....	75
5.2 FENOTIPAGEM DO LOCO <i>CHE2</i> E ATIVIDADE DA BChE.....	78
5.3 GENOTIPAGEM DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE <i>BCHE</i>	88
5.4 GENOTIPAGEM DOS EXONS DO LOCO <i>BCHE</i>	91
5.5 ANÁLISES RELATIVAS ÀS MUTAÇÕES –116A DO EXON 1 E A539T DO EXON 4.....	102
6 DISCUSSÃO	131
6.1 AMOSTRA TOTAL DE DOADORES DE SANGUE	131
6.2 FENOTIPAGEM DO LOCO <i>CHE2</i> E ATIVIDADE DA BChE.....	136
6.3 GENOTIPAGEM DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE <i>BCHE</i>	139
6.4 GENOTIPAGEM DOS EXONS DO LOCO <i>BCHE</i>	141
6.5 ANÁLISES RELATIVAS ÀS MUTAÇÕES –116A E A539T DO EXON 4	143
7 CONCLUSÕES.....	147
7.1 AMOSTRA DE DOADORES DE SANGUE	147
7.2 FENOTIPAGEM DO LOCO <i>CHE2</i> E ATIVIDADE DA BChE.....	147
7.3 GENOTIPAGEM DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE <i>BCHE</i>	148
7.4 GENOTIPAGEM DOS EXONS DO GENE <i>BCHE</i>	148
7.5 ANÁLISES RELATIVAS ÀS MUTAÇÕES -116A DO EXON 1 E A539T DO EXON 4	148
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1. Atividades biológicas propostas para as colinesterases.	4
Tabela 2.2 - Lista de variantes já descritas do gene <i>BCHE</i> .	19
Tabela 2.3. Valores do índice de massa corporal (IMC), classificação de categorias de peso corporal e risco de comorbidade.	35
Tabela 2.4. Valores do índice de massa corporal (IMC), classificação de categorias de peso corporal e risco de comorbidade para populações asiáticas.	36
Tabela 2.5. Evolução do Mapa Genético da Obesidade Humana de 1994 a 2003.	43
Tabela 2.6 Mutações em genes únicos relacionadas à obesidade em camundongos e homólogos em humanos.	44
Tabela 4.1. Pares de iniciadores utilizados para cada um dos oito segmentos do gene <i>BCHE</i> .	57
Tabela 4.2. Condições de eletroforese para os segmentos do gene <i>BCHE</i> analisados nesse estudo.	63
Tabela 5.1. Frequência percentual de obesos e não obesos nos Afro-brasileiros e Euro-brasileiros e na amostra total de doadores de sangue e valor de χ^2 e p para a comparação entre os grupos étnicos.	67
Tabela 5.2. Valores de χ^2 (p) para as comparações das proporções das categorias de peso normal, excesso de peso e obesidade entre as faixas etárias.	69
Tabela 5.3. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias de idade dos indivíduos pertencentes às categorias IMC de peso normal, obesidade leve e grave.	71
Tabela 5.4. Médias e variâncias de idade (\pm EP) e comparações (t; p e F; p) entre obesos e não obesos nos homens, nas mulheres e na amostra total.	72
Tabela 5.5. Médias e variâncias de idade (\pm EP) e comparações (t; p e F; p) entre obesos e indivíduos de peso normal nos homens, nas mulheres e na amostra total.	73

Tabela 5.6. Resultados das comparações entre as médias e variâncias de idade dos três tipos de obesos nos 241 homens Euro-brasileiros obesos da amostra total de doadores de sangue.	75
Tabela 5.7. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e variâncias de idade dos três tipos de obesos da amostra desse estudo.	76
Tabela 5.8. Médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação (AV) da atividade enzimática (KU/L) nos obesos e nos controles e valores de t (p) e F (p) para a comparação entre as médias e variâncias.	79
Tabela 5.9. Frequências e números absolutos de indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5– nos grupos de obesos e controles. Valor de χ^2 (p) para a comparação das frequências fenotípicas entre obesos e controles.	81
Tabela 5.10. Médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação da atividade da BChE em obesos e controles, classificados como CHE2 C5+ e CHE2 C5– e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e as variâncias dentro do grupo de obesos e de controles.	82
Tabela 5.11. Valores de t (p) e F (p) para as comparações da atividade da BChE entre obesos e controles classificados como CHE2 C5+ e CHE2 C5–.	83
Tabela 5.12. Médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação do IMC em obesos classificados como CHE2 C5+ e CHE2 C5– e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e as variâncias.	84
Tabela 5.13. Número de obesos e controles analisados, através de duas diferentes condições de eletroforese SSCA, para os três fragmentos analisados da região regulatória a montante do gene <i>BCHE</i> .	88
Tabela 5.14. Resultado do sequenciamento de 12 indivíduos referente à região nt-116, através dos pares de iniciadores PRO3F e E1R e E1F e E1R.	94
Tabela 5.15. Frequências dos alelos identificados nos cinco fragmentos analisados do loco <i>BCHE</i> para obesos e controles e comparação das frequências alélicas entre obesos e controles ($\chi^2_{(1)}$; p).	96
Tabela 5.16. Frequências dos genótipos identificados nos cinco fragmentos analisados do gene <i>BCHE</i> e valores de χ^2 (p) para comparações entre obesos e controles.	97
Tabela 5.17. Valores de χ^2 (p) para teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg dos genótipos relativos às mutações identificadas nos fragmentos do gene <i>BCHE</i> em obesos, controles e no total.	98
Tabela 5.18. Número de indivíduos homozigotos <i>U/U</i> e heterozigotos para a mutação <i>D70G</i> (A) do exon 1 e seus genótipos quanto ao exon 4 do gene <i>BCHE</i> (A539T) em obesos, controles e na amostra total .	99

Tabela 5.19. Número e frequência percentual (% \pm EP) dos indivíduos heterozigotos <i>-116 G/-116 A</i> e homozigotos <i>-116 G/-116G</i> do exon 1, classificados como <i>U/U</i> , <i>U/A539T</i> e <i>A539T/A539T</i> para o polimorfismo <i>A539T</i> do exon 4.	100
Tabela 5.20. Frequências dos haplótipos referentes à posição -116 do exon 1 e à mutação <i>A539T</i> do exon 4, valores de χ^2 (p), D e D' para o desequilíbrio de ligação entre os dois sítios do gene <i>BCHE</i> .	101
Tabela 5.21. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE em obesos classificados de acordo com o genótipo relativo à variante -116A do exon 1 e valores de t (p) e F (p).	104
Tabela 5.22. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para obesos classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes -116A do exon 1 e <i>A539T</i> do exon 4.	105
Tabela 5.23. Valores de t (p) e F (p) para as comparações de médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para obesos classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes -116A do exon 1 e <i>A539T</i> do exon 4.	106
Tabela 5.24. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE em controles classificados de acordo com o genótipo relativo à variante -116A do exon 1 e valores de t (p) e F (p).	107
Tabela 5.25. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para controles classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes -116A do exon 1 e <i>A539T</i> do exon 4.	108
Tabela 5.26. Valores de t (p) e F (p) para as comparações de médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para controles classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes -116A do exon 1 e <i>A539T</i> do exon 4.	109
Tabela 5.27. Valores de χ^2 (p) para as comparações das frequências genotípicas para a variante <i>A539T</i> nos obesos leves e nos obesos graves e mórbidos reunidos.	110
Tabela 5.28. Média (\pm EP) e variância de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos obesos classificados de acordo com a presença ou ausência da variante <i>A539T</i> e valores de t (p) e F (p).	111
Tabela 5.29. Média (\pm EP) e variância de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos obesos classificados como <i>U/A539T</i> e <i>A539T/A539T</i> e valores de t (p) e F (p) para comparações entre médias e variâncias.	112

Tabela 5.30. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e variâncias de obesos <i>U/U</i> x <i>U/A539T</i> e <i>U/U</i> x <i>A539T /A539T</i> .	113
Tabela 5.31. Médias, variâncias e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre obesos classificados como <i>U/U</i> e <i>U/A539T+ A539T/ A539T</i> para cada quartil de IMC.	114
Tabela 5.32. Médias, variâncias, amplitudes de variação (AV) e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre obesos classificados como <i>U/U</i> e <i>U/A539T</i> para cada quartil de IMC.	115
Tabela 5.33. Genótipos referentes à mutação <i>-116A</i> do exon 1 e à mutação <i>A539T</i> do exon 4 nos obesos pertencentes ao quartil superior de IMC.	116
Tabela 5.34. Média (\pm EP) e variância de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos controles classificados de acordo com a presença ou ausência da variante <i>A539T</i> e valores de t (p) e F (p) para comparações entre médias e variâncias.	117
Tabela 5.35. Média (\pm EP), variância e amplitude de variação (AV) de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos controles classificados <i>U/A539T</i> e <i>A539T/ A539T</i> .	118
Tabela 5.36. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e variâncias de peso, altura, IMC, idade e atividade da BChE em controles <i>U/U</i> x <i>U/A539T</i> e <i>U/U</i> x <i>A539T /A539T</i> .	119
Tabela 5.37. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre médias e variâncias de altura entre obesos e controles classificados de acordo com os genótipos relativos à variante <i>A539T</i> .	120
Tabela 5.38. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre médias e variâncias de idade entre obesos e controles classificados de acordo com os genótipos relativos à variante <i>A539T</i> .	121
Tabela 5.39. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre médias e variâncias de atividade da BChE entre obesos e controles classificados de acordo com os genótipos relativos à variante <i>A539T</i> .	122
Tabela 6.1. Frequências do fenótipo CHE2 C5+ ($\% \pm$ E.P.) em população de Curitiba ¹ e nas amostras do presente estudo e valores de $\chi^2_{(1)}$ (p) para as comparações entre essas frequências.	136

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Superposição da BChE, TcAChE e AChE de <i>Drosophila melanogaster</i> na região da entrada do sítio ativo.	10
Figura 2.2. Alça Ω da BChE e aminoácidos que interagem com ela.	11
Figura 2.3. Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i> , mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem.	13
Figura 2.4. Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população com 20 ou mais anos de idade, por sexo. Brasil – períodos 1974-1975, 1989 e 2002-2003, de acordo com o IBGE (2003).	39
Figura 4.1. Distribuição de indivíduos classificados como obesos leves ($30 \leq \text{IMC} < 35$), graves ($35 \leq \text{IMC} < 40$) e mórbidos ($\text{IMC} \geq 40$), na amostra total de homens Euro-brasileiros e na amostra desse estudo.	50
Figura 4.2. Percentagem de indivíduos, por categoria de IMC de acordo com a OMS, na amostra total de 2953 doadores de sangue.	51
Figura 4.3. Curvas de IMC da amostra de obesos ($N = 153$) e da amostra controle ($N = 153$).	52
Figura 4.4. Curvas de idade da amostra de obesos ($N = 153$) e da amostra controle ($N = 153$).	52
Figura 4.5. Representação esquemática da região regulatória a montante do gene <i>BCHE</i> .	58
Figura 4.6. Representação esquemática do final da região regulatória do gene <i>BCHE</i> , exon 1 e início do intron 1.	59
Figura 4.7. Representação esquemática de parte do exon 2 do gene <i>BCHE</i> .	60
Figura 4.8. Representação esquemática de parte do intron 3, exon 4 e início da região 3' não traduzida do gene <i>BCHE</i> .	61
Figura 5.1. Percentagens de homens e mulheres por categoria de IMC, de acordo com a OMS, em amostra de 2953 doadores de sangue de Curitiba.	66
Figura 5.2. Distribuição de indivíduos por categorias de IMC por faixa etária na amostra total de doadores de sangue de Curitiba.	68
Figura 5.3. Médias de idade, em anos, dos indivíduos da amostra total que apresentam déficit de peso, peso normal, excesso de peso, obesidade leve, grave e mórbida.	70

Figura 5.4. Distribuição de idade para 308 obesos e 1517 indivíduos com peso normal.	74
Figura 5.5. Médias de idade (\pm EP) dos indivíduos obesos leves, graves e mórbidos componentes da amostra desse estudo.	76
Figura 5.6. Distribuição da idade em 123 obesos leves e 30 obesos graves e mórbidos reunidos.	77
Figura 5.7. Distribuição da atividade da BChE (KU/L) em 153 obesos e 153 controles.	80
Figura 5.8. Reprodução de uma placa de gel de ágar 1,4%, pH 6,38, submetida à eletroforese, permitindo a identificação dos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.	81
Figura 5.9. Distribuição da atividade da BChE (KU/L) em oito obesos CHE2 C5+ e 145 obesos CHE2 C5-.	85
Figura 5.10. Distribuição da atividade da BChE (KU/L) em 16 controles CHE2 C5+ e 137 controles CHE2 C5-.	86
Figura 5.11. Distribuição do IMC em oito obesos CHE2 C5+ e 145 CHE2 C5-.	87
Figura 5.12. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, contendo os fragmentos de 151 pb (RR1) da região regulatória a montante, amplificados pelos iniciadores PROF1 e PROR1.	89
Figura 5.13. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos de 187 pb (RR2) da região regulatória a montante, amplificados pelos iniciadores PROF2 e PROR2.	89
Figura 5.14. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos de 176 pb (RR3) da região regulatória a montante, amplificados pelos iniciadores PROF3 e PROR3.	90
Figura 5.15. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 1 amplificados pelos iniciadores E1F e E1R.	92
Figura 5.16. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 2 amplificados pelos iniciadores N25 e N23.	92

Figura 5.17. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 2 amplificados pelos iniciadores P25 e N53.	93
Figura 5.18. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 2 amplificados pelos iniciadores N75 e N73.	93
Figura 5.19. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos amplificados do exon 4 pelos iniciadores P43 e P45.	94
Figura 5.20. Eletroferograma da região do nt -116 do gene <i>BCHE</i> , permitindo a identificação de homozigose (G/G) na posição nt-116.	95
Figura 5.21. Eletroferograma da região do nt -116 do gene <i>BCHE</i> , permitindo a identificação de heterozigose (G/A) na posição nt-116.	95
Figura 5.22. Distribuição de peso (kg) de 93 obesos <i>U/U</i> e 49 obesos <i>U/A539 + A539/A539</i> .	123
Figura 5.23. Distribuição de altura (cm) de 93 obesos <i>U/U</i> e 49 obesos <i>U/A539 + A539/A539</i> .	124
Figura 5.24. Distribuição de IMC de 93 obesos <i>U/U</i> e 49 obesos <i>U/A539 + A539/A539</i> .	125
Figura 5.25. Distribuição de atividade da BChE de 93 obesos <i>U/U</i> e 49 obesos <i>U/A539 + A539/A539</i> .	126
Figura 5.26. Distribuição de peso (kg) de 96 controles <i>U/U</i> e 49 controles <i>U/A539 + A539/A539</i> .	127
Figura 5.27. Distribuição de altura (cm) de 96 controles <i>U/U</i> e 49 controles <i>U/A539 + A539/A539</i> .	128
Figura 5.28. Distribuição de IMC de 96 controles <i>U/U</i> e 49 controles <i>U/A539 + A539/A539</i> .	129
Figura 5.29. Distribuição de atividade da BChE de 96 controles <i>U/U</i> e 49 controles <i>U/A539 + A539/A539</i> .	130
Figura 6.1. Percentagens das categorias déficit de peso, peso normal, excesso de peso e obesidade para a população de Curitiba (IBGE, 2003) e para a amostra de doadores de sangue.	132
Figura 6.2. Proporções de peso normal, excesso de peso e obesidade, por faixa etária para a população brasileira (IBGE, 2003).	134

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAA	Arilacilamidase
AChE	Acetilcolinesterase
<i>ACHE</i>	Gene da acetilcolinesterase
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
AV	Amplitude de variação
BChE	Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	Gene da butirilcolinesterase
BMI	Body mass index
<i>CHE2</i>	Loco condicionador do complexo C5 da butirilcolinesterase
Cys (C)	Cisteína
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EP	Erro padrão
GH	Hormônio de crescimento
<i>GHRL</i>	Gene da ghrelina
GHS-R	Receptor do secretagogo de hormônio de crescimento
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutâmico
Gly (G)	Glicina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná

His (H)	Histidina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ile (I)	Isoleucina
IMC	Índice de massa corporal
Iso-OMPA	Tetraisopropilpirofosforamida
K _m	Constante de Michaelis
LCAT	Lecitina-colesterol-acil-transferase
Leu (L)	Leucina
<i>LEP</i>	Gene da leptina
<i>LEPR</i>	Gene receptor de leptina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Lys (K)	Lisina
<i>MC4R</i>	Gene do receptor de melanocortina 4
Met (M)	Metionina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PCSK1</i>	Gene da convertase 1
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
<i>POMC</i>	Gene da pro-opiomelanocortina
RCQ	Razão cintura quadril
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser (S)	Serina
SSCA	<i>Single Strand Conformational Analysis</i>
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA

Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	<i>World Health Organization</i>
WHR	Waist hip ratio

RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica que já foi associada ao metabolismo de lípidos e a variáveis relacionadas à obesidade, como altura, peso, IMC, RCQ, colesterol, triglicérides e lipoproteínas. Para investigar a associação entre a obesidade e a BChE, variantes do gene *BCHE* e do loco *CHE2*, bem como a atividade dessa enzima, foram analisados em homens Euro-brasileiros doadores de sangue (153 obesos e 153 controles não obesos, pareados por idade). Essa amostra foi selecionada de uma amostra maior de doadores de sangue de Curitiba (N = 2953), para a qual são apresentados alguns dados relativos à epidemiologia da obesidade. A atividade média da BChE é maior nos obesos, concordando com dados da literatura. O alelo *CHE2**C5+ está associado a um aumento da atividade da BChE, tanto em obesos como em controles. O fenótipo *CHE2* C5+ tem frequência menor em obesos ($5,2\% \pm 1,8\%$) que em controles de peso normal ($10,5\% \pm 2,5\%$) e que em outra amostra de doadores de sangue de Curitiba ($10,2\% \pm 0,6\%$), sugerindo que esse fenótipo tem efeito protetor em relação à predisposição à obesidade em homens adultos. Não foi encontrada nenhuma variação na parte investigada da região regulatória a montante do gene *BCHE*. Foram identificadas as seguintes mutações nos segmentos investigados dos exons do gene *BCHE*: -116A (exon 1); D70G (exon 2), T243M (exon 2); G390V (exon 2) e A539T (exon 4), sendo esse o primeiro relato da frequência do alelo -116A em população brasileira ($8,5\% \pm 1,5\%$). As frequências alélicas e genóticas de todas essas mutações são semelhantes em obesos e controles, não diferindo daquelas disponíveis na literatura. O genótipo -116G/-116A está associado a um aumento da média de IMC nos obesos e a uma diminuição na atividade média da BChE em obesos e controles. Considerando obesos, o grupo genotípico U/A539T + A539T/A539T têm menor variância (4,87) de IMC que o genótipo U/U (11,48; F = 2,35; p = 0,001), devida, principalmente, ao grupo constituinte do quartil superior da distribuição de IMC. Nesse quartil, a média de IMC no genótipo U/A539T ($35,57 \pm 0,31$) é menor que no genótipo U/U ($38,04 \pm 0,69$; t = 2,38 e p = 0,02), sugerindo um efeito protetor do genótipo U/A539T, em relação ao agravamento da obesidade. De modo geral, os dados do presente estudo reforçam a hipótese de um papel da BChE em processos metabólicos relacionados à obesidade.

ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE) is a serum esterase previously associated to lipid metabolism and to variables related to obesity such as, height, weight, BMI, WHR, cholesterol, triglycerides and lipoproteins. In order to investigate association between obesity and BChE, variants of the *BCHE* gene and of the *CHE2* locus, as well as BChE activity, were analyzed in Euro-Brazilian blood donor men (153 obese and 153 non obese individuals, paired by age). This sample was selected from a larger blood donor sample from Curitiba (N = 2953) for which some data on obesity epidemiology are presented. The mean BChE activity is higher in obese individuals, in accordance with data from the literature. The *CHE2**C5+ allele is associated to an increase in BChE activity both in obese and in control individuals. The *CHE2* C5+ phenotype presented lower frequency in obese individuals ($5.2\% \pm 1.8\%$) than in non obese controls ($10.5\% \pm 2.5\%$) and also lower frequency than in another blood donor sample from Curitiba ($10.2\% \pm 0.6\%$), suggesting that this phenotype has a protective effect in relation to obesity susceptibility in adult men. None variation was found in the investigated part of the regulatory region upstream the *BCHE* gene. The following mutations were identified in the examined segments of the *BCHE* exons: -116A (exon 1); D70G (exon 2), T243M (exon 2); G390V (exon 2) and A539T (exon 4); providing the first report on the frequency of the -116A allele for the Brazilian population ($8.5\% \pm 1.5\%$). Allele and genotype frequencies of all these mutations are similar in obese and control individuals, and do not differ from those available in the literature. The -116G/-116A genotype is associated to an increase in the BMI mean in the obese group and to a decrease in the mean BChE activity both in the obese and control groups. Considering obese individuals, the U/A539T + A539T/A539T genotype group presented lower BMI variance (4.87) than the U/U genotype (11.48; $F = 2.35$; $p = 0.001$), mainly due to individuals belonging to the superior quartile of the BMI distribution. In this quartile, the BMI mean of the U/A539T genotype (35.57 ± 0.31) is lower than in the U/U genotype (38.04 ± 0.69 ; $t = 2.38$ and $p = 0.02$), suggesting a protective effect of the U/A539T genotype in relation to the increase of BMI in obesity. In general, data from the present study reinforce the hypothesis of a role for BChE in the metabolic processes related to obesity.

1 INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8) é uma enzima polimórfica, sendo a maioria das variantes genéticas codificadas pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2). O loco *CHE2* codifica uma substância, cuja natureza permanece desconhecida, que se associa ao tetrâmero da BChE formando o complexo C5. Esse loco apresenta os alelos *CHE2**C5+ e *CHE2**C5– responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência do complexo C5.

A BChE é uma esterase sérica, sintetizada no fígado e amplamente distribuída no organismo. Além da atividade colinérgica, possui, também, atividade de aril-acilamidase amino-sensível. Apesar de sua função fisiológica ainda não ter sido completamente esclarecida, a BChE já foi associada à proliferação celular e à tumorigênese, ao crescimento neural, à adesão celular, ao metabolismo de lípidos e a variáveis relacionadas à obesidade, como altura, peso, IMC (índice de massa corporal), RCQ (razão cintura quadril), colesterol, triglicérides e lipoproteínas.

A obesidade é uma doença complexa de proporções globais caracterizada por um depósito excessivo de gordura no organismo, sendo o índice de massa corporal (IMC) o método mais amplamente utilizado para seu diagnóstico. As formas comuns de obesidade são poligênicas e multifatoriais e diversos estudos já identificaram locos relacionados à obesidade em todos os autossomos e no cromossomo X.

Esse estudo analisou a variabilidade do loco *CHE2*, de parte do gene *BCHE* e da atividade da BChE em homens Euro-brasileiros, obesos ($IMC \geq 30$; $N = 153$) e de peso normal ($20 \leq IMC < 25$; $N = 153$). Os dois grupos, pareados pela idade, foram investigados quanto à associação entre variantes moleculares e fenotípicas da BChE e obesidade. As amostras de obesos e controles foram selecionadas a partir de uma amostra maior ($N = 2953$) de doadores de sangue de Curitiba (HEMEPAR), que foi utilizada para análises relativas à epidemiologia da obesidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLINESTERASES

As esterases podem ser classificadas em três tipos principais de acordo com seu substrato preferencial. As esterases aromáticas hidrolisam ésteres aromáticos, as aliesterases hidrolisam, preferencialmente, ésteres alifáticos e as colinesterases hidrolisam, com maior eficiência, ésteres de colina. As colinesterases são também diferenciadas das demais esterases por serem inibidas pela fisostigmina na concentração de 10^{-5}M (AUGUSTINSSON, 1963). No sangue humano existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE).

A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7), também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, é responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas e existem estudos que sugerem a coexistência de outras funções não colinérgicas (BALASUBRAMANIAN, 1984; GREENFIELD, 1984 e GRIFMAN et al., 1998). A AChE existe em diferentes formas moleculares, ocorre na membrana eritrocitária, na placa motora de músculos esqueléticos e em áreas do cérebro onde não há evidência de função colinérgica, sugerindo a existência de funções não colinérgicas. A AChE modula o crescimento neural e a adesão celular em células de neuroblastoma humano *in vitro*. A forma tetramérica da AChE (G4), está associada à adesão celular independente da sua atividade colinérgica, mas dependente do sítio aniônico da enzima (JOHNSON e MOORE, 2000).

A butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), anteriormente chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase e colinesterase não específica, é sintetizada no fígado, sendo também encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE et al., 1947). Mais recentemente, sua síntese nos adipócitos foi sugerida em ratos (ORES KOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992) e em humanos (POPOVIC et al., 1998). Hidrolisa vários ésteres de colina, desde a acetilcolina até a heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. A função da BChE no organismo e o seu substrato natural permanecem desconhecidos. Existem hipóteses que relacionam a BChE à proteção da

acetilcolinesterase (WHITTAKER, 1980; WHITTAKER, 1986) e ao metabolismo de lípides (KUTTY, 1980).

MESULAM et al. (2002) analisaram camundongos normais e nulizigotos para acetilcolinesterase e verificaram que todos os componentes anatômicos principais das vias colinérgicas centrais se desenvolveram normalmente. Apesar de não ocorrer aumento compensatório na distribuição da BChE, foi detectada atividade da BChE em todas as áreas do cérebro que recebem inervação colinérgica, tanto nos camundongos nulizigotos para AChE quanto nos camundongos normais. Estes experimentos sugerem que a AChE não é necessária para o estabelecimento das vias colinérgicas e que a BChE pode substituir a AChE, exercendo uma função constitutiva de hidrólise da acetilcolina no cérebro normal.

A sequência de aminoácidos da BChE e da AChE tem 53% de identidade, sendo bem conservada no sítio ativo. As duas enzimas apresentam respostas similares a diversos inibidores (SCHUMACHER et al., 1986; LOCKRIDGE et al., 1987a) e semelhança imunológica (GEORGE et al., 2001). A análise filogenética da expressão da BChE e da AChE indica que essas duas enzimas surgiram a partir de um precursor comum cuja função era hidrolisar a acetilcolina. Em *Drosophila*, um único gene de colinesterase codifica uma enzima que hidrolisa acetilcolina, a qual apresenta extensa homologia com a AChE de *Torpedo californica* (HALL e SPIERER, 1986) e atividade intermediária entre AChE e BChE (TOUTANT, 1989). Algumas outras colinesterases de invertebrados também mostram baixa especificidade a substrato (PRITCHARD et al., 1994). Portanto, os genes *ACHE* e *BCHE* surgiram por duplicação gênica, depois do surgimento de sistemas colinérgicos.

As colinesterases (AChE e BChE) exibem atividades catalíticas adicionais, além da hidrólise de ésteres de colina. A similaridade nas seqüências de diferentes esterases, lipases, tiroglobulina, proteínas de adesão celular e colinesterases sugere que as colinesterases podem exibir mais de uma atividade biológica e funções biológicas mais amplas (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993; WEITNAUER et al., 1998). A tabela 2.1 mostra as atividades biológicas já propostas para AChE e BChE.

Tabela 2.1. Atividades biológicas propostas para as colinesterases.

Atividade biológica	Colinesterases
Aril-acilamidase amino-sensível	AChE e BChE
Hidrólise de cocaína	BChE
Crescimento e diferenciação de células neurais	AChE e BChE
Divisão celular e tumorigênese	AChE e BChE
Interação célula-célula	AChE e BChE
Funções não colinérgicas na <i>substantia nigra</i>	AChE

Fonte: Adaptado de BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993.

AChE e BChE apresentam atividade de aril acilamidase amino-sensível, uma atividade semelhante à amidase e sem função fisiológica conhecida (GEORGE e BALASUBRAMANIAN, 1981; JAYANTHI et al., 1992; JAGANATHAN e BOOPATHY, 2000). A ligação acil-amida rompida pela aril-acilamidase amino-sensível (AAA) é semelhante àquela encontrada em drogas analgésicas como paracetamol e fenacetina. Se alguma dessas drogas sintéticas for desacilada por AAA, é possível que a serotonina, que inibe AAA, possa ajudar a prolongar a vida de tais drogas na circulação e melhorar seus efeitos analgésicos. Embora não tenha sido possível demonstrar a quebra desses fármacos por AAA, é possível conceber a existência de componentes analgésicos endógenos suscetíveis à hidrólise por AAA e sua modulação pela acetilcolina e serotonina, sugerindo um papel para as colinesterases no mecanismo da dor (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

A enxaqueca está correlacionada a um aumento de tiramina, uma amina vasoativa, comumente encontrada em alimentos. Embora a relação entre tiramina e enxaqueca não esteja clara, é possível especular que um aumento de tiramina estimule a ação de AAA na circulação, levando à degradação de um analgésico endógeno composto por acil-amida, resultando no desarranjo de um mecanismo natural de alívio da dor. A BChE poderia exercer um papel no mecanismo de dor

amino-sensível através da sua atividade de AAA modulada pela serotonina e pela tiramina (RAO et al., 1989; BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

WEITNAUER et al. (1998) analisaram a atividade de AAA da BChE em fetos de bovinos, galinhas e cavalos, encontrando atividade maior no soro fetal que no soro de cavalo ou de galinha. A atividade de AAA da BChE foi completamente inibida por drogas anticolinesterase em concentrações mais baixas do que aquelas necessárias à inibição da atividade da BChE em si. A atividade AAA da BChE é sensível à serotonina. Esses resultados sugerem que atividade de AAA é uma característica geral da BChE sérica de vertebrados, incluindo aves, sendo eficientemente inibida por agentes colinérgicos e serotoninérgicos. Devido à grande atividade encontrada no soro bovino fetal, AAA pode ter um papel no desenvolvimento. Funcionalmente, a atividade AAA das colinesterases poderia estabelecer uma ligação entre os sistemas neurotransmissores serotoninérgicos e colinérgicos através da desaminação de neuropeptídios, bem como apresentar um papel no metabolismo de lipoproteínas.

BOOPATHY e LAYER (2004) encontraram alta atividade de AAA tanto para AChE como para BChE em cérebro de embriões de galinha durante os primeiros estágios da vida embrionária, sugerindo que a atividade de AAA das colinesterases tem um papel nos primeiros estágios do desenvolvimento do cérebro.

Diversos estudos relataram a existência de atividade semelhante à tripsina e de carboxipeptidase em preparações de AChE de *Torpedo californica* (GEORGE e BALASUBRAMANIAN, 1980; SMALL et al., 1987) e de BChE (LOCKRIDGE, 1982; BOOPATHY e BALASUBRAMANIAN, 1987). As atividades de AAA e de esterase da AChE e da BChE estão perfeitamente correlacionadas, de modo que o aumento ou diminuição de uma delas é acompanhado pela mudança respectiva na outra. A atividade de peptidase não está correlacionada às atividades de AAA e de esterase da AChE, sugerindo que a atividade de peptidase não corresponde a uma função genuína da AChE e da BChE. CHECLER et al. (1994) observaram que as atividades de protease na AChE de *Torpedo californica* e em preparações de BChE humana sérica não eram imunoprecipitadas por anticorpos anti AChE e BChE, enquanto que as atividades AAA e de esterase sofriam imunoprecipitação, demonstrando que as

atividades de protease são devidas a contaminações nas preparações das colinesterases.

Diversos estudos propõem a existência de relação entre as colinesterases, tumorigênese e diferenciação celular (LAYER E SPORNS, 1987; LAPIDOT-LIFSON et al., 1989; PATINKIN et al., 1990; ZAKUT et al., 1990; SOREQ et al., 1991). No tubo neural de galinhas, antes de ocorrer a sinaptogênese, a BChE é distribuída difusamente nas camadas ventriculares, enquanto a AChE é localizada nas células da camada externa. O surgimento das duas colinesterases está correlacionado, especialmente, com as fases finais da proliferação celular em diferentes tecidos do cérebro e da retina do embrião de galinha. A expressão das colinesterases em períodos críticos do início da neurogênese sugere seu envolvimento no processo neurogenético (LAYER, 1990; ROBITZKI et al., 1998). Foi observada uma correlação entre a expressão da BChE e altas taxas proliferativas em neuroblastos do tubo neural, células de retina e outras (LAYER et al., 1992). WILLBOLD e LAYER (1992) consideraram a BChE como um marcador transmitótico devido à alta atividade da BChE tipicamente encontrada em células em estado transitório pouco antes do final da mitose e do início da diferenciação celular. A expressão da AChE e da BChE nos estágios iniciais da embriogênese, antes da formação das sinapses, também sugere que as colinesterases possuam um papel morfogênético nesse estágio do desenvolvimento neural.

BYTYQI et al. (2004) demonstraram que camundongos *knockout* para AChE apresentam defeitos no desenvolvimento da retina interna e conseqüente degeneração de foto-receptores. Durante os 75 dias subseqüentes ao nascimento, a camada de foto-receptores dos camundongos AChE^{-/-} degenerou completamente por apoptose. Como os níveis de BChE são normais em camundongos AChE^{-/-}, os efeitos observados se devem somente à falta da AChE, demonstrando um papel decisivo da AChE na formação da retina interna.

Padrões anormais de expressão dos genes *ACHE* e *BCHE*, bem como amplificação desses genes, foram associados com megacariocitopoese, leucemias e tumores no cérebro, no ovário e nas mamas. O bloqueio da expressão dos genes *ACHE* e *BCHE* interfere com a hematopoiese em cultivos celulares, sugerindo uma influência colinérgica na proliferação celular (LAPIDOT-LIFSON et al., 1989;

PATINKIN et al., 1990; ZAKUT et al., 1990; SOREQ et al., 1991; GARCIA-AYLLON et al., 2001; RUIZ-ESPEJO et al., 2002, 2003). SOREQ et al. (1991) sugeriram que uma sinalização colinérgica ineficiente pode alterar a atividade de quinases semelhantes a CDC2, acelerando a taxa de divisão celular e promovendo o crescimento tumoral.

Diversos estudos demonstram que a AChE tem uma função não colinérgica na *substantia nigra* do cérebro (LAST e GREENFIELD, 1987; GREENFIELD, 1991; WEBB e GREENFIELD, 1992; APPLEYARD, 1992; APPLEYARD e JAHNSEN, 1992; EMMET e GREENFIELD, 2004). Existe uma disparidade entre os altos níveis de AChE e os baixos níveis de acetilcolina na *substantia nigra* e a eletrofisiologia da colinesterase não está associada à hidrólise de acetilcolina. WEBB e GREENFIELD (1992) demonstraram a existência de um canal de potássio ativo na *substantia nigra* e que a AChE tem uma função não colinérgica na abertura desse canal. A região da AChE responsável por suas ações não clássicas, no cérebro, é distinta do seu sítio catalítico, correspondendo a um resíduo de 14 peptídeos, localizados entre os resíduos 586-599 na extremidade C-terminal da AChE humana. EMMET e GREENFIELD (2004) verificaram que esse fragmento de 14 peptídeos da AChE apresenta uma atividade biológica que pode envolver a regulação da disponibilidade de Cálcio.

A *overdose* de cocaína é um grave problema sem medicamentos amplamente efetivos. Uma alternativa à terapia convencional com antagonistas de receptores é aumentar a taxa de inativação metabólica da cocaína. A enzima de maior relevância para desintoxicação é a BChE, que converte cocaína em derivados menos ativos. O pré-tratamento com BChE humana, em ratos, reduz os efeitos cardíacos induzidos pela cocaína e pode prevenir a morte. Entretanto, a eficiência da BChE é baixa, sendo necessária grande quantidade para desintoxicar um paciente humano (STEWART et al. 1977; HOFFMAN et al., 1996; XIE et al., 1999; SUN et al., 2001; PIC, 2005). SUN et al. (2002) produziram uma BChE modificada a partir de modelos computacionais, que apresenta ponto de saturação suficiente para desintoxicar um paciente humano.

2.2 ESTRUTURA BIOQUÍMICA DA BChE HUMANA

Existem diversas formas moleculares da BChE presentes em um mesmo organismo. A BChE humana apresenta quatro formas moleculares principais identificadas através de eletroforese denominadas C_1 , C_2 , C_3 , C_4 (HARRIS et al., 1962). A forma C_1 é um monômero, C_2 é um monômero ligado à albumina, C_3 é um dímero e C_4 , que é a forma mais abundante da BChE plasmática, é um tetrâmero formado por um dímero de dímeros, onde cada dímero é constituído por dois monômeros unidos por uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys571. A ligação entre os dímeros que se unem para formar o tetrâmero C_4 se processa através de interações não covalentes (LOCKRIDGE et al., 1979; 1987b; LOCKRIDGE e LA DU, 1982; MASSON, 1989).

Outra nomenclatura, baseada na estrutura molecular da BChE, foi sugerida em contraponto à nomenclatura baseada na mobilidade eletroforética (MASSON, 1989). Esta nomenclatura propõe as designações G_1 , G_2 , G_3 e G_4 , de acordo com o número de subunidades moleculares. A forma C_1 corresponde à forma globular monomérica, sendo denominada de G_1 , a forma C_2 , que é um monômero ligado à albumina, é referido como G_1 -ALB, o dímero C_3 é denominado G_2 e o tetrâmero C_4 corresponde à G_4 . A designação G_3 corresponde ao trímero de mobilidade intermediária entre C_3 e C_4 que se forma progressivamente a partir de C_4 submetido à tripsina, plasmina e outras proteases.

O monômero da BChE humana é formado por uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos e nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligados a nove asparaginas. O peso molecular, que é calculado com base na sequência de aminoácidos e oligossacarídeos, é de 85.534 kDa e os quatro monômeros, que formam o tetrâmero, são idênticos (LOCKRIDGE et al., 1987b).

MILLARD e BROOMFIELD (1992) construíram um modelo tridimensional da BChE humana derivado por análise computacional a partir da estrutura cristalográfica da AChE de *Torpedo californica* (TcAChE) que apresenta 53,8% de identidade com a BChE humana (LOCKRIDGE et al., 1987a). Nesse modelo, a estrutura terciária da BChE é semelhante à da AChE, mas a entrada do sulco que

leva à triade catalítica (Glu 325, His 438 e Ser 198) do sítio ativo apresenta diferenças. Os nove oligossacarídeos, já identificados na BChE, ocorrem fora do sulco de entrada do sítio ativo, a maioria localizada em uma só face do monômero.

NICOLET et al. (2003) determinaram a estrutura cristalográfica da BChE humana que é, de modo geral, bastante similar à estrutura da TcAChE (figura 2.1). Entretanto, na BChE, os resíduos aromáticos encontrados na entrada do sítio da TcAChE foram substituídos por resíduos hidrofóbicos e no bolso de ligação de grupamento acil foram substituídos os resíduos Phe288 e Phe290 da TcAChE por Leu286 e Val288, respectivamente. Essas mudanças tornam possível a ligação de uma gama maior de substratos na BChE em relação à AChE. A conformação da alça acil também apresenta diferenças entre TcAChE e BChE.

O sítio aniônico periférico da BChE humana está envolvido no mecanismo de ativação de substratos (figura 2.2). Dois locais de ligação de substrato, Asp70 no sítio aniônico periférico e Trp82 no sítio ativo, são conectados por uma alça ômega (Ω). A ativação do substrato da BChE envolve a participação de diferentes domínios na entrada do sítio ativo da enzima, incluindo o sítio aniônico periférico (Asp70 e Tyr332), o sub-sítio de ligação do sítio ativo (Trp82 e Ala328), o resíduo estabilizador Glu197 e o resíduo Asn83 da alça Ω (MASSON et al., 2001).

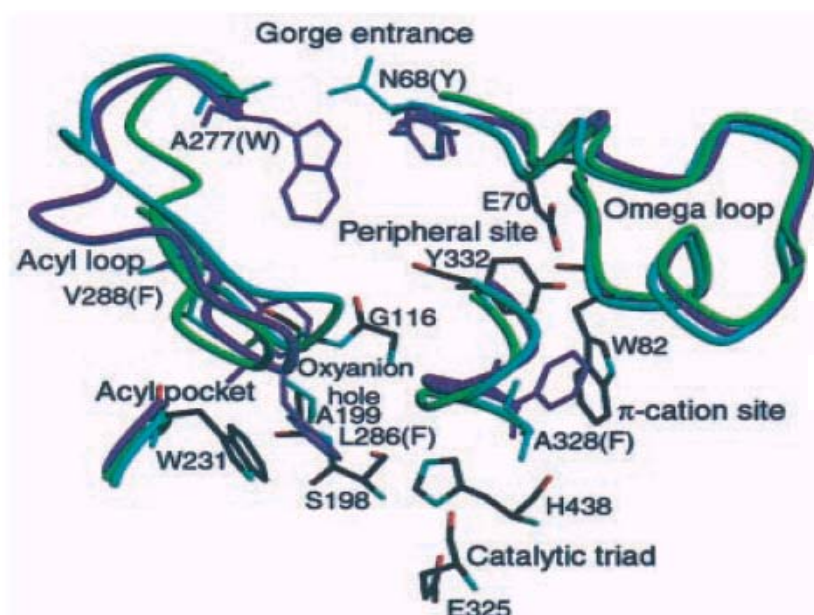


Figura 2.1. Superposição da BChE (azul claro), TcAChE (azul escuro) e AChE de *Drosophila melanogaster* (verde) na região da entrada do sítio ativo (Fonte: NICOLET et al., 2003).

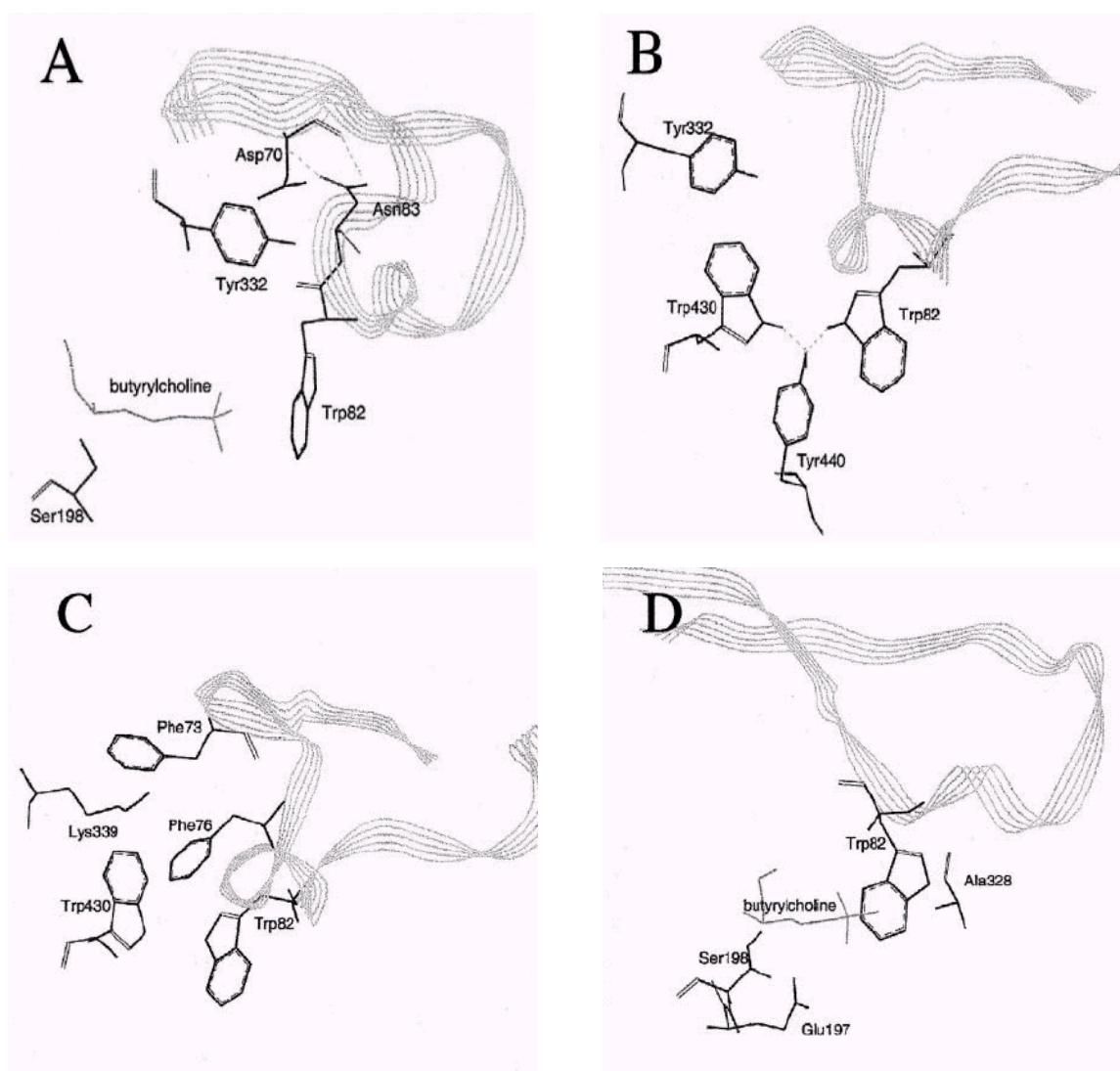


Figura 2.2. Alça Ω da BChE e aminoácidos que interagem com ela. (A) O sítio aniônico periférico da BChE é definido pelos resíduos Asp70 e Tyr332. Ao entrar no canal do sítio ativo, a butiriltocolina liga-se ao sítio aniônico periférico e subsequentemente ao Trp82. A fita é a alça Ω formada pelos aminoácidos 65 a 92. Asn83 é ligado por ponte de hidrogênio à Asp70. O sítio ativo é a Ser198 no fundo do túnel. A distância entre o sítio aniônico periférico e o sítio ativo é de cerca de 10 Å. (B) Trp430 interage com Trp82, Tyr332 e Tyr440. (C) Lys339 interage com Phe73 e Phe76 na alça Ω . (D) Os resíduos Trp82, Glu197 e Ala328 estão envolvidos na ligação com o substrato. (Fonte: MASSON et al., 2001)

2.3 GENE *BCHE*

As evidências da provável existência de um único gene que codifica a BChE, bem como a estrutura desse gene, foram mostradas por ARPAGAUSS et al. (1990). O gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) tem 64.558 kb (NCBI, acessado em 11/05/2005) e possui quatro exons formados por 2.445 pares de bases. Como a BChE é formada por 574 resíduos de aminoácidos, apenas 1722 pares de bases codificam para a enzima madura, sendo que os 723 pares de bases não codificantes da enzima madura correspondem ao exon 1, à parte inicial do exon 2 e à parte final do exon 4. O exon 1 (149 pb) contém seqüências não traduzidas e dois sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2 (1.525 pb) contém 83% da seqüência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um terceiro possível sítio de início de tradução no codon -28. O primeiro codon que codifica para o peptídeo maduro é numerado como +1 e está localizado no exon 2. O exon 3 tem 167 nucleotídeos e o exon 4 (604 pb) codifica a extremidade C-terminal da proteína e a região 3' não traduzida que contém dois sinais de poliadenilação. O intron 1 tem 6,272 kb, o intron 2 tem 56,512 kb e o intron 3 tem 12,638 kb (NCBI, acessado em 11/05/2005). A figura 2.3 mostra um desenho esquemático do gene *BCHE*.

O mRNA da BChE humana possui 40,24% de C+G, que é, aproximadamente, a proporção dessas bases no genoma humano. Comparações entre as proteínas colinérgicas de mamíferos e aves (BChE, AChE, receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina e colina acetiltransferase) mostram que o gene da BChE possui um conteúdo menor de C+G em relação a outras proteínas colinérgicas. O conteúdo de C+G pode ser importante para a regulação ao nível transcricional, pois o genoma de animais homeotermos pode ser dividido em domínios com conteúdos altos e baixos de C+G chamados de isocoros. A posição dos genes em isocoros é conservada durante a evolução, o que pode ser constatado no gene da BChE humana e de coelho que conservam o baixo conteúdo de C+G. Como os isocoros não são igualmente transcritos em diferentes tecidos, AChE e BChE, que diferem na proporção de C+G e que, provavelmente, pertencem a duas unidades transcricionais distintas do genoma, podem ser utilizadas sucessiva ou alternadamente em tecidos diferentes (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989).



Figura 2.3. Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região hachurada corresponde à proteína madura.

JBILLO et al. (1994) analisaram a região regulatória a montante da região codificadora, identificaram o sítio de início da transcrição do gene *BCHE* e localizaram um sítio de ligação para AP1, dois para Oct-1 (proteína ligadora de octâmero), quatro para topoisomerase e quatro elementos que contêm seqüências similares ao sítio de ligação da classe Ets de oncoproteínas (PEA3). A região regulatória a montante do gene *BCHE* apresenta homologia com fatores de iniciação encontrados em outros genes sem TATA *box*, que são regulados durante o desenvolvimento. O seqüenciamento dessa região permitiu a identificação de vários sítios de ligação para fatores de transcrição que poderiam promover a sua expressão no início do desenvolvimento e durante a proliferação celular (JBILLO et al., 1994). Existem 157 bases entre o sítio cap e o iniciador; 84 bases no peptídeo sinal; 1722 bases codificando para os aminoácidos 1-574 e 483 bases na região 3' não traduzida desde o final da seqüência codificadora até o início da cauda poli A. Existem dois sítios poli A funcionais, sendo provável que um deles determine forma anfifílica, ainda não encontrada na BChE, mas produzida na AChE por processamento alternativo.

O fator de transcrição AP1, que tem um papel fundamental no crescimento e diferenciação de células epiteliais, é um heterodímero formado por proteínas codificadas pelos genes de duas subfamílias Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2) e Jun (c-Jun, JunD e JunB), que conferem a esse complexo a habilidade de reconhecer seqüências específicas de DNA, chamadas de elementos responsivos tetradecanoil forbol acetato ou sítios de ligação AP1 (NAKABEPPU et al., 1988; ANGEL e KARIN, 1991), que são encontrados nas regiões regulatórias de diversos genes, como

aqueles relacionados ao ciclo celular (MARINISSEN et al., 2001). Proteínas AP1 são, freqüentemente, o alvo final de cascatas de quinases transdutoras de sinal, tornando-se ativas quando fosforiladas e ativando promotores e levando à expressão dos genes correspondentes (CAVIGELLI et al., 1995). JBILO et al. (1994) identificaram um sítio de ligação AP1 situado 71 pb a montante do sítio de início de transcrição, dentro do fragmento de 200 pb definido como promotor mínimo, do gene *BCHE* humano. A transcrição dos genes de mamíferos pela RNA polimerase II tem início em um nucleotídeo específico, cuja localização é determinada por um elemento localizado a montante denominado *TATA box*, ou por um elemento localizado no sítio de início da transcrição chamado iniciador. Na ausência do *TATA box*, o iniciador necessita de ativação por um elemento localizado a montante (SMALE et al., 1990). Uma vez que o gene *BCHE* humano não apresenta uma sequência consenso *TATA box*, a ativação do elemento de iniciação pode ocorrer através de um fator AP1, pois o plasmídeo pCB58wI, construído por JBILO et al. (1994), que não continha o sítio AP1 não apresentava atividade de promotor.

Em mamíferos, muitos genes regulados pelo desenvolvimento e envolvidos na regulação do crescimento têm motivos de ligação de PEA3 nas suas regiões regulatórias. Muitos membros da família Ets de proto-oncogenes são capazes de se ligar ao motivo PEA3, podendo exercer efeitos positivos e negativos na transcrição de genes de eucariotos (MARTIN et al., 1992). Os motivos PEA3 (ativados por Ets) e AP1 podem funcionar sinergisticamente para a ativação da transcrição (WASYLYK et al., 1990).

A proteína ligadora de octâmero (Oct-1), é um membro amplamente expresso da família POU de fatores de transcrição. Oct-1 é fundamental para a expressão de genes de imunoglobulina (Ig) restritos a linfócitos B, para a regulação, durante o ciclo celular, do gene da histona H2B, e para a transcrição constitutiva dos genes de RNA pequeno nuclear (snRNA) pela RNA pol II ou RNA pol III (KRAPP e STRUBIN, 1999). Oct-1 é caracterizada por um domínio único bipartido de ligação ao DNA chamado de POU, composto de um sub-domínio homeótico variante (POU-H), que é ligado a um sub-domínio conservado denominado POU-específico (POU-S). Os dois sub-domínios contêm motivos hélice-volta-hélice que se associam diretamente aos dois componentes do sítio bipartido de ligação ao

DNA. Os membros da família POU de fatores de transcrição estão relacionados a uma ampla variedade de funções durante o desenvolvimento. Oct-1 pode exercer múltiplas funções distintas durante o desenvolvimento e no adulto. Existe evidência de que os fatores de transcrição da família POU desempenhem papéis na inibição e promoção da proliferação celular e na determinação de linhagens celulares, bem como na migração, sobrevivência e final da diferenciação das células (ANDERSEN e ROSENFELD, 2001). O sítio de ligação de Oct-1, identificado no gene *BCHE* humano (JBILO et al., 1994), é um octâmero (ATTTGCAT) que pode ser reconhecido por vários membros da família POU de fatores de transcrição, incluindo Oct-1, Oct-3 e Oct-4. Oct-3 e Oct-4 (SCHOLER et al., 1989, ROSNER et al., 1990) estão presentes em células embrionárias totipotentes e pluripotentes de camundongos e são negativamente regulados com o avanço da diferenciação celular, sugerindo que tenham um papel no início do desenvolvimento.

A DNA topoisomerase II, (DNA topo II), tem um papel fundamental no controle da conformação do DNA e dos cromossomos inteiros, sendo essencial para eventos celulares como a replicação e transcrição do DNA, condensação e segregação cromossômica. É a única enzima que pode cortar e reunir duplas hélices de DNA e que é utilizada para aliviar o estresse de torção causado durante a replicação, transcrição e reparo de DNA. É particularmente ativa durante as fases G2 e M do ciclo celular, estando envolvida em diversos aspectos do metabolismo de DNA e da topologia da cromatina (MIKHAILOV et al., 2004). A topoisomerase II é altamente expressa em células de mamíferos em cultura durante a proliferação celular, tendo sua expressão reduzida durante a diferenciação (HSIANG et al., 1988).

2.4 LOCO *CHE2*

Em eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, além das bandas C₁ a C₄, HARRIS et al. (1962) e HARRIS et al. (1963a) encontraram uma banda que foi denominada C₅. Essa banda foi encontrada em apenas 4,6% da amostra e o gene responsável pela sua determinação foi chamado *CHE2* e apresenta os alelos *CHE2**C₅⁺ e *CHE2**C₅⁻ responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C₅. CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) encontraram, em amostra da população de Curitiba, o fenótipo *CHE2**C₅⁺ com frequência de

10,3%. SUGIMORI (1986) demonstrou que os indivíduos CHE2 C5+ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos CHE2 C5-. HARRIS (1980) relata que indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ apresentam atividade média da BChE cerca de 30% superior à de indivíduos CHE2 C5-. Foi proposto um padrão de herança autossômico dominante para a presença da banda C5 (HARRIS et al, 1962).

A banda C5 é determinada, tanto pelo loco *BCHE*, como pelo loco *CHE2*, que condiciona uma substância cuja estrutura permanece desconhecida. HARRIS et al. (1963b) estudaram a segregação mendeliana em duas famílias e verificaram a independência entre os alelos do gene *BCHE* e a banda C5. A participação do loco *BCHE* na determinação da banda C5 é verificada pelo uso do inibidor Ro2-0683, que inibe as bandas C4 e C5, totalmente em soros de fenótipo usual e parcialmente em soros de fenótipo atípico. Uma associação entre a BChE e uma proteína codificada pelo loco *CHE2* foi proposta por SCOTT e POWERS (1974) como a provável formação da banda C5.

MASSON (1991), baseado em seu trabalho anterior (MASSON, 1989), no qual demonstrou que a isoenzima C2 é formada pela associação entre BChE e albumina, considera possível uma origem semelhante para a formação de C5 e sugere que C5 seja uma banda híbrida, formada pela banda C4 associada a outra proteína (X). Vários experimentos foram realizados na tentativa de estabelecer a estrutura de C5. Eletroforese em gel de poliacrilamida e comparação com um padrão de peso molecular mostraram que o peso molecular de C5 é de 400 kDa. Este valor de 400 kDa é 60 kDa maior que o peso molecular de C4, de modo que essa diferença pode ser atribuída à proteína X que se liga à C4 para a formação de C5. O tratamento com tripsina, bem como com altas concentrações de sal (NaCl 1,5-4,0M) causam a dissociação de C5, originando C4. A banda C5 não se dissocia sob a ação de agentes redutores ou pressão de 3,5 kbar. Esses resultados indicam que C5 é formada pela associação de C4, através de ligações não covalentes e com predomínio de interações iônicas, a uma proteína. No mesmo trabalho, MASSON (1991) procurou identificar a proteína X e os resultados obtidos não permitiram sua identificação, mas descartaram várias hipóteses. A análise de géis corados de

eletroforeses de plasmas CHE2 C5⁺ incubados por 30 minutos em soluções tamponadas de bambuterol (10^{-8} - 10^{-4} M) mostrou curvas de inibição paralelas para C₄ e C₅. Essas curvas de inibição paralelas, frente a um inibidor específico da BChE (bambuterol), demonstram que a banda C₅ não é um híbrido de AChE/BChE. Experimentos por imunoabsorção e imunodeteção descartaram a possibilidade de C₅ ser um agregado de C₂. A possibilidade de que C₅ poderia ser uma imunoglobulina foi considerada, desde que GALLANGO e ARENDS (1969) detectaram C₅ em sangue de pacientes com mieloma, porém anticorpos contra cadeias κ e ι de imunoglobulina não detectaram tal fragmento em isolado de C₅. A banda C₅ não se apresentou sensível à colagenase, descartando a possibilidade da substância X ser identificada como colágeno. O mapeamento do gene da fibronectina como pertencente ao cromossomo 2 (KOCH et al., 1982), próximo à região designada para *CHE2* (EIBERG et al., 1989), levantou a possibilidade de C₅ ser formada pela associação de C₄ com fragmento de fibronectina. Essa hipótese foi rejeitada, pois C₅ não foi reconhecida por anticorpos policlonais para fibronectina humana.

AKIZUKI et al. (2004) analisaram as regiões codificadoras e não traduzidas do gene *BCHE*, buscando diferenças estruturais nesse gene entre indivíduos com fenótipos CHE2 C5⁺ e CHE2 C5⁻. Esses autores não verificaram associação entre variantes do gene *BCHE* e o fenótipo CHE2 C5⁺, sugerindo que não há relação entre o aumento de atividade da BChE, que é verificado em CHE2 C5⁺, e os variantes do gene *BCHE*. O tratamento do soro desses indivíduos com anti-imunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM) não teve efeito na atividade da BChE e a atividade específica da BChE no componente C₅ foi entre 30 e 54% maior que aquela calculada para os demais componentes da BChE. AKIZUKI et al. (2004) sugerem que não há relação entre os variantes do gene *BCHE* e o fenótipo CHE2 C5⁺ e que, embora a atividade específica da BChE seja aumentada no variante C₅, permanece desconhecida a natureza da substância produzida pelo loco *CHE2*, responsável pelo fenótipo CHE2 C5⁺.

2.5 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*

A BChE é uma enzima polimórfica e a existência de variabilidade genética da BChE foi, pela primeira vez, constatada em pacientes que sofriam de apnéia e paralisia muscular prolongadas quando submetidos a doses farmacológicas de succinilcolina, um relaxante muscular pré-operatório (KALOW e GENEST, 1957). Alguns alelos do gene *BCHE* podem ser identificados por inibição enzimática (KALOW e STARON, 1957). O uso dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil amônio] e de acetato de α -naftila como substrato (ALCÂNTARA et al., 1991; PICHETH et al., 1994) possibilita a classificação de alguns fenótipos. Dibucaína e fluoreto de sódio também podem ser utilizados como inibidores para evidenciar variantes fenotípicas da BChE. O seqüenciamento do gene *BCHE* (ARPAGAUSS et al., 1990) vem permitindo a identificação de uma gama maior de variantes desse gene por análise do DNA.

As variantes da BChE que têm atividade inferior a 10% do nível da enzima usual são denominadas de silenciosas (PRIMO-PARMO, 1993). Existem, também, polimorfismos descritos na região não codificadora do gene, como as mutações nt -116 no exon 1 e nt 1914 no exon 4 (BARTELS et al., 1990). A tabela 2.2 mostra essas mutações, a nomenclatura formal de cada uma delas e as alterações de aminoácidos correspondentes. A seguir uma breve descrição de algumas variantes da BChE, principalmente daquelas que primeiro foram identificadas.

A variante resistente à dibucaína, ou atípica, é a variante mais freqüentemente responsável pela resposta prolongada de relaxamento muscular após administração intravenosa de doses farmacológicas de succinilcolina. A enzima atípica tem afinidade reduzida por ésteres de colina que normalmente se ligam ao sítio aniônico da enzima. MCGUIRE et al. (1989) identificaram molecularmente o alelo A, responsável pelo fenótipo atípico da BChE, como uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 que altera o códon 70 de GAT para GGT (Asp70→Gly; *D70G*). O resíduo Asp70 é um local de ligação de substrato no sítio aniônico periférico da BChE (MASSON et al., 2001), de modo que a substituição de um aminoácido ácido por um aminoácido neutro (Asp→Gly) levaria à diminuição de afinidade por ésteres de colina.

Tabela 2.2 - Lista de variantes já descritas do gene *BCHE*, incluindo alteração de nucleotídeo, nome do alelo e referências bibliográficas.

Alteração de nucleotídeo	Nome ^a	Referência
Exon 1		
-116; G→A		BARTELS et al., 1990
Exon 2		
9-11; CATCAT→CAT	<i>I4del</i>	MAEKAWA et al., 1997
16; ATT→TT	<i>I6fs</i>	BARTELS et al., 1992b; PRIMO-PARMO et al., 1996
35; AAA→AGA	<i>K12R</i>	MIKAMI, 2005
45; GGG→GGC	<i>G15G</i>	MIKAMI, 2005
71; ACG→ATG	<i>T24M</i>	MAEKAWA et al., 1997
82; TTT→ATT	<i>F28I</i>	YEN et al., 2003
98; TAT→TGT	<i>Y33C</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
109; CCT→TCT	<i>P37S</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
208; GAT→CAT	<i>D70H</i>	BOECK et al., 2002
209; GAT→GGT	<i>D70G (A)</i>	MCGUIRE et al., 1989
223; GGC→CGC	<i>G75R</i>	SOUZA et al., 2005b
270; GAA→GAC	<i>E90D</i>	SOUZA et al., 2005b
286; AAT→TAT	<i>N96Y</i>	YEN et al., 2003
297; ATT→ATG	<i>I99M</i>	SOUZA et al., 2005b
298; CCA→TCA	<i>P100S</i>	MAEKAWA et al., 1997
318; AAT→AAAT	<i>N106fs</i>	YEN et al., 2003
344; GGT→GAT	<i>G115D</i>	PRIMO-PARMO et al., 1997
351; GGT→GGAG	<i>G117fs</i>	NOGUEIRA et al., 1990
355; CAA→TAA	<i>Q119X</i>	SUDO et al., 1996
375; TTA→TTT	<i>L125F</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
383; TAT→TGT	<i>Y128C</i>	HIDAKA et al., 1997
424; GTG→ATG	<i>V142M (H)</i>	JENSEN et al., 1992
486; GCT→GCC	<i>A162A</i>	SOUZA et al., 2005b
510; GAT→GAG	<i>D170E</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
514; CAG→TAG	<i>Q172X</i>	GÄTKE et al., 2001
551; GCC→GTC	<i>A184V (SC)</i>	GREENBERG et al., 1995
592; AGT→GGT	<i>S198G</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
596; GCA→GTA	<i>A199V</i>	SAKAMOTO et al., 1998
601; GCA→ACA	<i>A201T</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
607; TCA→CCA	<i>S203P</i>	HIDAKA et al., 2001
728; ACG→ATG	<i>T243M (F-I)</i>	NOGUEIRA et al., 1992
748; ACT→CCT	<i>T250P</i>	MAEKAWA et al., 1995
765; GAG→GAC	<i>E255D</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
800; AAA→AGA	<i>K267R</i>	MAEKAWA et al., 1997
811; GAA→TAA	<i>E271X</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
880; GTG→ATG	<i>V294M</i>	MIKAMI, 2005
943; ACC→AACC	<i>T315fs</i>	HIDAKA et al., 1992

continua

Alteração de nucleotídeo	Nome ^a	Referência
943; ACC→TCC	<i>T315S</i>	LIU et al., 2002
988; TTA→ATA	<i>L330I</i>	SUDO et al., 1997
997; GGT→TGT	<i>G333C</i>	MIKAMI, 2005
1062 – 1076	<i>K355insALU</i>	MURATANI et al., 1991
1093; GGA→CGA	<i>G365R</i>	HIDAKA et al., 1992; HADA et al., 1992
1156; CGT→TGT	<i>R386C</i>	YEN et al., 2003
1169; GGT→GTT	<i>G390V (F-2)</i>	NOGUEIRA et al., 1992
1200; TGC→TGA	<i>C400X</i>	HIDAKA et al., 1997
1253; TTC→TCC	<i>F418S</i>	MAEKAWA et al., 1995
1270; CGA→TGA	<i>R424X</i>	YEN et al., 2003
1273; TCC→CCC	<i>S425P</i>	GNATT et al., 1990
1294; GAA→TAA	<i>E432X</i>	LEVANO et al., 2005
1303; GGA→AGA	<i>G435R</i>	DEY et al., 1997
1336; TTT→GTT	<i>F446V</i>	DEY et al., 1998
1351; GAA→TAA	<i>E451X</i>	DEY et al., 1998
1378; GAG→AAG	<i>E460K</i>	YEN et al., 2003
1393; AGA→TGA	<i>R465X</i>	MAEKAWA et al., 1995
1408; CGG→TGG	<i>R470W</i>	MIKAMI, 2005
1411; TGG→CGG	<i>W471R</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
Intron 2		
IVS2-8T→G		PRIMO-PARMO et al., 1996
Exon 3		
1490; GAA→GTA	<i>E497V (J)</i>	BARTELS et al., 1992 ^a
1500; TAT→TAA	<i>Y500X</i>	BARTELS et al., 1992b; PRIMO-PARMO et al., 1996
1543; CGT→TGT	<i>R515C</i>	MAEKAWA et al., 1995
1553; CAA→CTA	<i>Q518L</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
Exon 4		
1615; GCA→ACA	<i>A539T (K)</i>	BARTELS et al., 1992 ^a
1914 A→G		BARTELS et al., 1990

^a = nome comum entre parênteses

Com dados de DNA, MCGUIRE et al. (1989) estimaram a frequência do alelo *D70G* em cerca de 2%, em população caucasóide da América do Norte. MIKAMI (2005) encontrou valor semelhante (1,80%) em doadores de sangue Euro-brasileiros da população de Curitiba.

A enzima F (resistente ao fluoreto), assim como a enzima A, é incapaz de hidrolisar succinilcolina em doses farmacológicas devido a alterações na sua estrutura. O fenótipo F é caracterizado através de inibição enzimática, sendo resistente à inibição pelo fluoreto e mostrando números baixos de inibição pela

dibucaína (HARRIS e WHITTAKER, 1961). Existem duas mutações de ponto associadas ao fenótipo F (NOGUEIRA et al., 1992), a variante F-1 (*T243M*) resulta de uma mutação de ponto no nucleotídeo 828 que altera Thr 243 para metionina e a variante F-2 (*G390V*) é determinada por uma mutação de ponto no nucleotídeo 1169 que altera Gly 390 para Val.

A frequência do alelo F, que inclui *T243M* e *G390V*, estimada com base em inibição enzimática, é de cerca de 0,5%, na maioria das populações estudadas (WHITTAKER, 1986). Com base em análise de DNA, MIKAMI (2005) encontrou em Euro-brasileiros de Curitiba a frequência de 0,28% para cada um desses alelos.

A mutação no nucleotídeo 551 (GCC→GTC; *A184V*), responsável pelo fenótipo SC, resulta em uma enzima com capacidade diminuída de hidrolisar succinilcolina, mantendo afinidade normal por substratos substitutos e com resistência normal aos inibidores diferenciais (GREENBERG et al., 1995). A única estimativa da frequência do alelo *A184V* (0,70%) foi relatada para Euro-brasileiros de Curitiba (MIKAMI, 2005).

As enzimas variantes J e K da BChE humana são duas variantes quantitativas que reduzem o número de moléculas circulantes da BChE em 66% (GARRY et al., 1976) e 33% (RUBINSTEIN et al., 1978), respectivamente. A enzima K é determinada por uma mutação de ponto de guanina para adenina no nucleotídeo 1615 (G→A), levando a uma substituição de Ala539 por Thr (*A539T*; BARTELS et al., 1992b). A mutação K foi encontrada em cerca de 90% dos genes que continham a mutação de ponto *D70G*, responsável pelo fenótipo atípico da BChE (GAT→GGT; Asp70→Gly). A presença conjunta das mutações K e A na mesma molécula não altera qualitativamente a enzima variante atípica, mas parece levar a uma redução de cerca de um terço da $V_{m\acute{a}x}$ da atividade da enzima atípica. O fenótipo variante J está associado com a mutação *A539T* e com uma transversão A→T no nucleotídeo 1.490 no exon 3 do gene *BCHE*, levando à substituição de Glu497 para Val (GAA→GTA; *E497V*) (BARTELS et al., 1992a).

De acordo com ALTAMIRANO et al. (2000), a mutação *A539T* não parece ter nenhum efeito na estrutura ou atividade da BChE, pois a enzima K não apresenta diferenças com a BChE usual ou selvagem em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou formação sérica de tetrâmeros. Os

autores sugerem que o decréscimo no número de moléculas circulantes da BChE, associado ao fenótipo variante K, pode ser causado por mutações na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*.

O alelo *A539T* é o mais freqüente dentre as variantes não-usuais da BChE, tendo sido encontrado com freqüência de 12,8% em população norte-americana (BARTELS et al., 1992b), 19,6% em população escocesa (GAFFNEY e CAMPBELL, 1994), 16,4% (SHIBUTA et al., 1994) e 17,5% (IZUMI et al., 1994) em amostras da população japonesa, 18% em população dinamarquesa (JENSEN et al., 1996). No Brasil, SOUZA et al. (1998), estudando amostras de brancos e miscigenados (branco X negro), obtiveram as freqüências de 18,4% e 17,1%, respectivamente, que não diferem estatisticamente.

A variante H da BChE humana é uma variante quantitativa rara que reduz em cerca de 90% os níveis séricos da BChE. O fenótipo H foi identificado por WHITTAKER e BRITTEN (1987) em dois pacientes do Hospital Hammersmith em Londres, que apresentavam alta sensibilidade à succinilcolina e pareciam ser heterozigotos para os alelos atípico (*D70G*) e usual. Análises das famílias dos dois pacientes mostraram que uma variante da BChE, responsável por uma atividade muito baixa, de cerca de 10% da atividade da enzima usual, fora herdada por diversos membros. JENSEN et al. (1992) encontraram uma mutação de ponto no nucleotídeo 424, alterando o aminoácido 142 de Val para Met (*V142M*). A mutação *D70G* (atípica) foi encontrada em cis nos quatro indivíduos portadores da mutação H.

O fenótipo silencioso da BChE humana é caracterizado por uma queda de mais de 90% da atividade da enzima em relação à média do fenótipo usual, ou, pela ausência total de atividade enzimática. A existência de alelos silenciosos da BChE foi sugerida, inicialmente, para explicar a herança anômala do fenótipo atípico (KALOW e STARON, 1957; HARRIS et al., 1960) e somente mais tarde foram identificados indivíduos sem atividade da BChE (HART e MITCHELL, 1962; LIDDELL et al., 1962) ou com apenas 2%-3% da atividade da enzima usual (GOEDDE et al., 1965).

Atualmente, um grande número de alelos silenciosos foi identificado no gene *BCHE*, por análise de DNA, gerando substituição de aminoácidos, alteração na

matriz de leitura e formação de códons de terminação prematura (tabela 2.2), indicando a grande heterogeneidade molecular do fenótipo silencioso. A frequência global do fenótipo silencioso é de 1 em 100.000.

Em nosso laboratório, foram encontradas três mutações que alteram a atividade específica da BChE: *E90D* (SOUZA et al., 2005b; MIKAMI, 2005), caracterizada como sem atividade; *G75R* com 45% da atividade usual (SOUZA et al., 2005b; MIKAMI, 2005) e *G333C* com 20% dessa atividade (MIKAMI, 2005).

2.6 BChE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO IMC

O tecido adiposo é responsável pelo armazenamento de energia sob a forma de triglicérides e pela liberação de energia sob a forma de ácidos graxos livres durante períodos de jejum prolongado ou esforço muscular prolongado. Os lípides são substâncias que, devido a sua natureza hidrofóbica, não podem ser transportados livremente no plasma, devendo ser transportados no interior de estruturas hidrofílicas. As lipoproteínas são partículas esféricas constituídas por apoproteínas de caráter hidrofílico e por lípides, formando um complexo lipoprotéico. Os lípides constituintes das lipoproteínas são o colesterol e seus ésteres, fosfolípides e triglicérides.

As lipoproteínas são classificadas de acordo com sua densidade, composição lipídica e composição protéica. Quanto à densidade são classificadas como: quilomicrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL) e lipoproteínas de densidade muito alta (VHDL). Com o aumento da fração protéica, aumenta a densidade da lipoproteína, diminuindo proporcionalmente o conteúdo lipídico. De acordo com a composição lipídica, os quilomicrons e as VLDL contêm principalmente triglicérides, as LDL transportam predominantemente colesterol esterificado, as HDL transportam fosfolípides e as VHDL são complexos de ácidos graxos livres e albumina ou fosfolípides e albumina. Em relação à parte protéica, as lipoproteínas são classificadas em seis famílias de apoproteínas (A-F) que são também separadas em subgrupos. Algumas apoproteínas são encontradas preferencialmente em determinado tipo de lipoproteína. Nas HDL são encontradas preferencialmente as apoproteínas A-I e A-II, nas LDL apoproteína B-100 e nas

VLDL apoproteína C (NOVAK e BYDLOWSKI, 1996).

Os quilomicrons, sintetizados e secretados pela mucosa intestinal, transportam, principalmente, triglicérides exógenos. As VLDL, que transportam preferencialmente triglicérides endógenos, são secretadas, em forma nascente, pelo fígado. As LDL são possivelmente formadas a partir das VLDL circulantes e da degradação de quilomicrons. Transportam, essencialmente, colesterol exógeno e endógeno para os tecidos extra-hepáticos. As HDL são secretadas pelo fígado e provavelmente pelo intestino delgado e por outros órgãos. Transportam o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde é degradado produzindo ácidos biliares.

As hiperlipidemias são distúrbios metabólicos caracterizados por um nível elevado de uma ou mais lipoproteínas. Estes distúrbios foram classificados por FREDRICKSON et al. (1967), sendo a classificação posteriormente modificada por BEAUMONT et al. (1970). Esta classificação sugere seis tipos de hiperlipidemias: tipo I, caracterizada por um aumento no nível de quilomicrons (hiperlipemia exógena); tipo II-a, com aumento no nível de LDL (hipercolesterolemia); tipo II-b, detectada pelo aumento de LDL e VLDL (hiperlipemia combinada); tipo III, caracterizada por um aumento de VLDL remanescente rica em colesterol e triglicérides (hiperlipemia remanescente); tipo IV, onde se observa aumento de VLDL (hiperlipemia endógena) e tipo V, onde é característico um aumento nos níveis de quilomicrons e VLDL (hiperlipidemia).

LAWRENCE e MELNICK (1961) encontraram traços de atividade da BChE na lipoproteína beta (LDL) e observaram um aumento nessa atividade após o tratamento do soro com ultrassom. Os autores sugeriram a formação de um complexo LDL/BChE, mantido por ligação física e facilmente desfeito por oscilação sônica. DUBBS (1966) expôs amostras de soros, por diferentes períodos de tempo, à radiação sônica e mostrou que ocorria aumento de atividade da BChE após tratamento com ultrassom.

KUTTY e ACHARYA (1972) observaram que inibidores da BChE, como a fisostigmina, desestabilizam a lipoproteína LDL. Em um trabalho posterior, KUTTY et al. (1973) verificaram a atividade da BChE em coelhos tratados com endotoxina de *E. coli*, que provoca hiperlipoproteinemia. Observaram aumento na atividade da BChE e na concentração de VLDL após 24 horas de tratamento. Entre 48 e 72

horas, verificaram redução de VLDL e da BChE e simultâneo aumento de LDL e HDL. Os autores propuseram que a LDL seria formada pela ligação da pré-LDL com a BChE. Nesse mesmo trabalho, KUTTY et al. (1973) verificaram que a LDL humana, tratada com fosfolipase D, libera BChE, apresentando mobilidade eletroforética alterada.

Analizando a atividade da BChE em um paciente acidentalmente intoxicado pelo organofosforado parathion, KUTTY et al. (1975) observaram que, tanto a atividade da enzima quanto a concentração de LDL, encontravam-se diminuídas. Cobaias, tratadas com o organofosforado iodeto de fosfolina, apresentaram o mesmo comportamento no que se refere à atividade enzimática e ao conteúdo de LDL. Os autores sugeriram que a queda no nível de LDL pudesse ser causada pela diminuição da BChE.

KUTTY et al. (1977) verificaram a atividade da BChE em precipitados de LDL e observaram que a atividade da enzima no precipitado era diretamente proporcional à concentração da lipoproteína observada no soro. Demonstraram ainda, através de incorporação de H_3 -lisina, que camundongos, quando tratados com o inibidor da BChE neostigmina, apresentavam diminuição da síntese de lipoproteína beta (LDL) e aumento da síntese de lipoproteína alfa (HDL). Reafirmaram a sua hipótese, sugerida em trabalho anterior (KUTTY et al, 1973), de que a VLDL formaria HDL e pré-LDL que se ligaria à BChE formando LDL. Diversos estudos posteriores trazem evidência da existência de um papel da BChE na síntese de lipoproteínas (OLINIC et al., 1999; ALCÂNTARA et al., 2002; TUTOR-CRESPO et al., 2004).

RYHÄNEN et al. (1982) observaram que, dentre as frações de lipoproteínas, a fração de VHDL era a que mostrava maior atividade da BChE. Buscando verificar uma possível relação entre a concentração de colesterol e triglicérides e a atividade da BChE, mediram os níveis desses lípidos nas diferentes frações lipoprotéicas. Observaram que a fração com maior nível de colesterol era a LDL e a fração com maior concentração de triglicérides era a VLDL. Após lavagem das frações, mostraram-se aumentadas, na fração de LDL, a concentração de colesterol e a atividade da BChE. Nas frações de HDL e VHDL observaram, após a lavagem, aumento de colesterol e diminuição na atividade da BChE. Em gel de

poliacrilamida foram detectadas oito bandas com atividade de BChE no soro total e nas frações de HDL e VHDL. Na fração de LDL foram observadas duas bandas com atividade da BChE e, após a lavagem, foram observadas três bandas. Os autores sugeriram que a lavagem remove inibidores da BChE presentes na fração LDL. Esses resultados vieram fortalecer a hipótese, já anteriormente sugerida (PUHAIKAINEN et al., 1980; KUTTY et al., 1981), de que na LDL o aumento de colesterol acarreta um aumento da atividade da BChE, enquanto que na HDL o colesterol inibe a atividade dessa enzima.

Em estudos com pacientes hipertensos, MAGARIAN e DIETZ (1987) verificaram correlação positiva entre atividade da BChE e as concentrações de colesterol (total LDL-C e HDL-C) e de triglicérides. Observaram correlação negativa entre a atividade da BChE e as razões colesterol da HDL/colesterol total e colesterol da HDL/colesterol da LDL. Observaram que seus resultados estavam em concordância com resultados anteriores que indicavam relação entre BChE e metabolismo lipoprotéico. MAGARIAN e DIETZ (1987) sugeriram que a ligação física da BChE com LDL e HDL não significa relação de causa e efeito.

KÁLMÁN et al. (2004) encontraram aumento significativo da atividade da BChE no soro de pacientes com hiperlipidemia do tipo IIb quando comparados com um grupo controle, sugerindo uma associação entre atividade da BChE e metabolismo anormal de lípidos.

Muitos estudos sugerem que a BChE está relacionada ao metabolismo de lípidos e às lipoproteínas. HUTCHINSON et al. (1951) observaram que homens subnutridos que se recuperavam e engordavam mostravam atividade elevada da BChE. BARRY et al. (1954), baseando-se nos resultados de HUTCHINSON et al. (1951), estudaram a relação entre gordura subcutânea e atividade da BChE em 345 homens ingleses considerados em equilíbrio metabólico. Foi verificada correlação positiva entre a atividade da BChE e a gordura superficial. Essa correlação não era afetada pelo consumo de calorias e apenas levemente influenciada pelo peso. Diversos estudos (ANTOPOL et al., 1937; FABER, 1943; CRISTOL et al., 1946) mostram um aumento na atividade da BChE em pacientes com diabetes, o que levou à sugestão de uma relação entre BChE e metabolismo de gorduras (BARRY et al., 1954). CLITHEROW et al. (1963) propuseram que o papel da BChE no

metabolismo de lípidos seria hidrolisar ésteres de colina, preferencialmente butirilcolina, que são subprodutos do catabolismo de ácidos graxos livres e da lipogênese no fígado. Desse modo, tanto um aumento na disponibilidade e/ou fluxo de ácidos graxos livres para o fígado quanto um aumento da lipogênese a partir de carboidratos, poderiam levar a dois efeitos: hiperlipemia e atividade elevada da BChE. Os resultados de CUCUIANU et al. (1968) vieram a concordar com a hipótese sugerida por CLITHEROW et al. (1963). O trabalho de CUCUIANU et al. (1968) consistiu em examinar quatro grupos de indivíduos com relação aos níveis de colesterol e triglicérides (lípidos séricos) e de atividade da BChE. Um grupo controle normolipêmico com peso normal, um grupo de obesos normolipêmicos, um grupo controle hiperlipêmico com peso normal e um grupo de obesos hiperlipêmicos. Observaram elevação significativa da atividade da BChE nos grupos não-controle, mostrando, também, que para um mesmo nível de lípidos séricos ocorria um aumento na atividade da BChE em indivíduos obesos.

CUCUIANU et al. (1978) analisaram indivíduos hiperlipoproteinêmicos dos tipos II-a, misto, IV e V, bem como indivíduos normais e obesos, em relação aos níveis de colesterol, triglicérides, LCAT (lecitina-colesterol-acil-transferase) e BChE. Os resultados mostraram que as enzimas LCAT e BChE têm as atividades correlacionadas entre si, com a concentração de colesterol e com o logaritmo da concentração de triglicérides. As atividades das duas enzimas mostraram-se significativamente mais altas nos indivíduos obesos e hiperlipêmicos, à exceção do tipo II-a. Considerando que o aumento das duas enzimas era devido à aceleração da cinética no transporte de lipoproteínas, os autores sugeriram que no tipo II-a, onde não fora observado aumento da atividade das enzimas, a hiperlipidemia seria causada por retardo no catabolismo da LDL.

CHU et al. (1978) estudaram indivíduos hiperlipêmicos dos tipos II-a, II-b e IV quanto aos níveis de BChE no soro e em precipitados de LDL. Observaram atividade da BChE aumentada no precipitado de LDL dos três tipos de hiperlipêmicos, enquanto que no soro a atividade aparecia aumentada apenas nos tipos II-b e IV, o que veio a concordar com os resultados de CUCUIANU et al. (1978). Nesse mesmo trabalho CHU et al. (1978) verificaram aumento da atividade da BChE concomitante com aumento de LDL, colesterol e triglicérides, no soro

bem como no precipitado de LDL. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que uma parte da butirilcolinesterase encontra-se livre no soro e outra parte ligada à LDL.

Estudando dois grupos de camundongos diabéticos e obesos, assim como os respectivos grupos de controles normais, KUTTY et al. (1981) verificaram atividade da BChE significativamente elevada no fígado e no soro dos camundongos diabéticos e geneticamente obesos. Os camundongos normais tratados com tioglucose também mostraram atividade da BChE significativamente maior. Após jejum de 24 horas a atividade da BChE, no fígado de camundongos diabéticos, reduziu-se a cerca de 40%. Nos camundongos obesos, o excesso de calorias leva à indução da atividade da BChE no fígado e à sua supressão no tecido adiposo, sugerindo que um dos intermediários do metabolismo de lípidos e carboidratos funcione como indutor ou repressor da BChE.

RYHÄNEN et al. (1984) estudaram, em coelhos, os efeitos de organofosforados sob a atividade das enzimas BChE, γ -GT e LCAT. Verificaram que após o uso do organofosforado dichlorvos não alterava a atividade da LCAT e diminuía a atividade da BChE e da γ -GT. O uso deste organofosforado não influenciou na concentração de VLDL, aumentou a concentração de HDL, triglicérides e ácidos graxos esterificados e baixou a concentração de LDL e de colesterol. NOUSIAINEN e RYHÄNEN (1984), estudando o efeito do organofosforado disulfiram em ratos, observaram que, após a administração do organofosforado, ocorreu diminuição da atividade da BChE e simultâneo aumento dos níveis séricos de colesterol. Estes resultados não estão de acordo com a hipótese de KUTTY et al. (1973, 1977) onde foi sugerido que ocorre uma ligação entre pré-LDL e BChE, produzindo LDL. NOUSIAINEN e RYHÄNEN (1984) sugeriram que os organofosforados, além de inibirem a BChE, induziriam mais receptores de LDL. Como hipótese alternativa, sugeriram que os organofosforados inibiriam a enzima HMG-CoA-redutase, reguladora da biossíntese do colesterol. O comportamento oposto da BChE e da HDL, posterior à administração do organofosforado, poderia ser atribuído à inibição de LCAT, que usa HDL como substrato.

Após o tratamento de ratos com alloxan, utilizado para provocar diabetes, DESHMUKH (1986) verificou um aumento significativo da BChE e do colesterol na

fração LDL+VLDL.

Estudos em nosso laboratório mostraram associação positiva entre atividade da BChE e peso (STUEBER-ODEBRECHT et al., 1985). Em trabalho posterior foi encontrada média de peso significativamente inferior em indivíduos CHE2 C5+, quando comparados a seus controles CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991). Esse resultado foi confirmado em trabalho seguinte (ALCÂNTARA et al. 2001), que verificou IMC mais baixo em indivíduos de fenótipo CHE2 C5+, do que em seus controles CHE2 C5-.

Em trabalho subsequente, ALCÂNTARA et al. (2003a) verificaram que a atividade média da BChE é significativamente maior em obesos que nos controles normais somente para indivíduos com fenótipo CHE2 C5-. Os autores sugerem que a associação positiva, previamente descrita, entre peso e aumento da atividade média da BChE pode depender da variabilidade do locus *CHE2*, ocorrendo apenas em indivíduos com fenótipo CHE2 C5-. O acompanhamento do peso de indivíduos obesos com fenótipo CHE2 C5- mostrou que 21,6% perderam e 2,6% ganharam peso, quando submetidos a dietas de baixas calorias. A atividade total média e a atividade da banda C_{4/5} mostraram-se significativamente menores nos indivíduos após o emagrecimento. Nos indivíduos com fenótipo CHE2 C5+, o acompanhamento dos pacientes mostrou que 56% perderam peso, sendo verificada uma frequência significativamente maior que nos indivíduos com fenótipo CHE2 C5-, levando os autores à sugestão de que o alelo *CHE2**C5+ pode predispor a uma maior facilidade para perder peso (ALCÂNTARA et al., 2003a).

ALCÂNTARA et al. (2003b) verificaram, em indivíduos com fenótipo CHE2 C5-, associação positiva entre a banda C_{4/5} e IMC, sugerindo uma relação entre esse complexo da BChE e metabolismo de lípidos.

A síndrome metabólica pode ser descrita como uma combinação de distúrbios, como resistência à insulina, hiperlipidemia e hipertensão. Em indivíduos obesos com fenótipo CHE2 C5- foi encontrada associação entre atividade da BChE, atividade absoluta das bandas eletroforéticas C_{4/5} e C_{OF} (outras formas) da BChE e síndrome metabólica (ALCÂNTARA et al., 2005). Os autores sugerem que o aumento dessas atividades da BChE não constituem fatores independentes de risco para

síndrome metabólica, mas que podem ser considerados como marcadores secundários de risco em indivíduos obesos com fenótipo CHE2 C5—.

A grelina é um hormônio peptídico produzido principalmente por células da submucosa do estômago e secretado nos vasos sanguíneos. É um ligante endógeno de receptores de moléculas secretagogas de hormônio de crescimento (GHS-R), estimulando a secreção pituitária do hormônio de crescimento (GH). A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos que apresenta um ácido n-octanóico na Ser3, que é essencial para a função endócrina da ghrelina, permitindo sua ligação ao GHS-R e a conseqüente secreção de GH (KOJIMA et al., 2001).

HOSODA et al. (2000) verificaram a existência de duas formas principais de grelina circulante: grelina (contendo o ácido n-octanóico na Ser3) e des-n-octanoil-grelina, sendo a segunda, que é incapaz de se ligar ao receptor GHS-R, muito mais abundante que a primeira. DE VRIESE et al. (2004) verificaram que a BChE purificada é capaz de degradar grelina, havendo uma correlação entre a atividade da BChE e a desoctonoilação da grelina no soro humano.

TSCHÖP et al. (2000) analisaram o efeito da administração periférica diária de grelina em ratos e camundongos e constataram um aumento significativo de peso pela redução da utilização de gorduras. No mesmo trabalho os autores verificaram que injeções intracerebroventriculares de grelina provocam hiperfagia e aumento de peso e que os níveis séricos de grelina aumentam durante o jejum, retornando aos níveis normais após a alimentação. TSCHÖP et al. (2000) sugerem que a grelina, além da regulação da secreção de GH, sinaliza para o hipotálamo a necessidade de um aumento na eficiência metabólica.

Para investigar o efeito da grelina na patogênese da obesidade humana, TSCHÖP et al. (2001) analisaram os níveis plasmáticos de grelina em indivíduos em jejum. Verificaram que os níveis plasmáticos de grelina estão negativamente correlacionados à insulina em jejum, à percentagem de gordura corporal, e à leptina. Também constataram que os níveis plasmáticos de grelina eram mais baixos em obesos que nos seus controles de peso normal. TSCHÖP et al. (2001) propuseram que a diminuição dos níveis plasmáticos de grelina observada em obesos é uma adaptação fisiológica ao balanço energético positivo associado à obesidade.

KORBONITS et al. (2002) analisaram o gene da grelina (*GHRL*; 3p26-p25) em crianças altas e obesas e identificaram dez SNPs, sendo que um deles (*L72M*) estava significativamente associado a um IMC maior. UKKOLA et al. (2001) encontraram associação entre o alelo *R51Q* do gene da grelina e obesidade em mulheres. HINNEY et al. (2002) analisaram a região codificadora do gene da grelina em crianças e adolescentes e encontraram os alelos *R51Q* e *L72M*, anteriormente descritos por UKKOLA et al. (2001) e KORBONITS et al. (2002), com frequências semelhantes em obesos e controles de peso normal. Identificaram ainda outros dois variantes do gene da grelina que também não apresentaram associação com a obesidade.

2.7 OBESIDADE: DEFINIÇÕES, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

A manutenção do estado de organização que caracteriza a vida depende da energia disponível. A vida mantém essa organização através da utilização de fontes de energia que permitem o funcionamento integrado de um organismo. Assim, como a energia disponível é condição imprescindível à existência da vida, a seleção natural deve ter levado as espécies a desenvolverem mecanismos para melhor obtenção e estocagem de energia. A captação e a metabolização de nutrientes do meio externo garantem a energia necessária para a manutenção e a reprodução dos organismos. A estocagem de energia em forma de biomoléculas, que podem ser disponibilizadas em caso de necessidade fisiológica, pode ser verificada em várias formas de vida, sendo as gorduras neutras (triglicérides) a fonte primária de estocagem de energia química potencial. A natureza hidrofóbica e a alta densidade calórica dos triglicérides possibilitam um modo eficiente de estocagem sem consequências osmóticas adversas.

Na maioria dos mamíferos, a massa adiposa tende a se manter relativamente estável por longos períodos. Tal estabilidade levou à sugestão de que um mecanismo homeostático regule a relação entre ingestão de comida e gasto energético, buscando manter a massa adiposa em um determinado nível. Esse mecanismo, porém, parece atuar mais eficientemente no sentido positivo, de modo que o volume de massa adiposa é facilmente excedido. Desse modo, o organismo parece possuir mecanismos fisiológicos eficientes para prevenir a perda de peso,

mas apenas mecanismos fracos para prevenir o seu ganho excessivo. Essa consideração pode ser relacionada à teoria denominada *thrifty genotype* que foi proposta a partir de estudos de diabetes (NEEL, 1962). De acordo com essa teoria, longos períodos de subnutrição no limite da sobrevivência levaram à fixação de um conjunto de alelos que promovem a estocagem de gordura em tempos de fartura. Para que fossem conservados no *pool* gênico, esses alelos teriam que aumentar a sobrevivência em períodos de fome, em maior escala que os possíveis riscos à saúde e à eficiência reprodutiva que pudessem acarretar. Esse aumento na sobrevivência teria, até mesmo, que sobrepujar o desenvolvimento de diabetes do tipo II, considerada originalmente, como diretamente promovida por esses mesmos alelos responsáveis pelo aumento da capacidade de estocagem de gordura. A natureza dos “thrifty genes” permaneceu incerta até que estudos familiares e análises clínicas trouxeram evidências de genes que contribuem para a obesidade humana, alterando a eficiência da estocagem de energia nos adipócitos, sem comprometer a sobrevivência ou a eficiência reprodutiva (ÖHMAN, 2001). A obesidade é caracterizada por um depósito excessivo de gordura no organismo. Esse depósito funciona como um estoque para o organismo, de modo que, os nutrientes não utilizados para produção imediata de energia passam a ser armazenados em forma de gordura para disponibilização posterior.

Como o comprometimento ao nível metabólico é bastante abrangente, obesidade e sobrepeso representam uma fonte crônica e debilitante de doença, com graves dimensões sociais e psicológicas, podendo afetar qualquer faixa etária e classe social. A obesidade leva à predisposição e à exacerbação de doenças como câncer de mama, de cólon, de rim e de vesícula, hipertensão, doença arterial coronariana e diabetes mellitus do tipo II. Algumas das influências negativas da obesidade dependem, até certo ponto, da distribuição de tecido adiposo. Gordura visceral intra-abdominal é crítica no desenvolvimento de hipertensão, concentração plasmática elevada de insulina, resistência à insulina e hiperlipidemia (KOPELMAN, 2000). O aumento da gordura corporal leva ao comprometimento das funções cardiovasculares, aumentando o volume sangüíneo total e, portanto, causando alterações estruturais no coração, como hipertrofia miocárdica e dilatação do ventrículo esquerdo (LAUER et al., 1991).

O risco de desenvolver diabetes do tipo II e hipertensão aumenta diretamente com a gordura corporal e, aproximadamente 85% das pessoas com diabetes do tipo II apresentam sobrepeso ou obesidade. Sobrepeso e obesidade crônicos contribuem significativamente para o desenvolvimento da osteoartrose, uma das causas principais de invalidez em adultos. Embora a obesidade deva, por si, ser considerada como uma doença, é, juntamente com o tabagismo, a pressão alta e o colesterol elevado, um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de doenças crônicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION TECHNICAL REPORT SERIES, 2003).

O sistema para classificar sobrepeso e obesidade em adultos, sugerido pela Organização Mundial de Saúde, é baseado no Índice de Massa Corporal (IMC), calculado como a razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros, com $IMC > 25$ definindo sobrepeso e $IMC \geq 30$ definindo obesidade.

O IMC correlaciona-se com a gordura corporal e, portanto, é amplamente utilizado em estudos de obesidade. Entretanto, a altura afeta os valores de IMC de modo não linear, fornecendo índices distorcidos para indivíduos muito altos ou muito baixos. Em pessoas muito altas o aumento de gordura corporal (excesso de peso) não aumenta o valor do IMC na mesma proporção que em pessoas muito baixas. O IMC é, também, dependente do sexo e da idade: em mulheres e em pessoas mais velhas o tecido adiposo corresponde, geralmente, a uma proporção maior da massa total do corpo (GALLAGHER et al., 1996). Para medir a proporção de gordura corporal podem, também, ser utilizadas a bioimpedância ou a ressonância magnética que fornecem a distribuição e o total de gordura em cada compartimento do corpo. Embora esses métodos sejam mais acurados, requerem mais recursos e, portanto, podem não estar disponíveis para todos os estudos relacionados à obesidade.

Os riscos associados à obesidade são mais eficientemente previstos levando em conta também o padrão de acúmulo de gordura intra-abdominal, através de medidas da circunferência da cintura e da razão cintura/quadril. Muitos fatores associados à dieta, estilo de vida e etnia são importantes para determinar a magnitude das complicações metabólicas e mecânicas associadas à obesidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION

TECHNICAL REPORT SERIES, 2003), as causas fundamentais da epidemia crescente de obesidade são o sedentarismo e as dietas hipercalóricas e ricas em gordura. Embora algumas pessoas possam se tornar obesas em decorrência de predisposição genética para ganhar peso, mesmo quando expostas a um ambiente desfavorável, o surgimento da epidemia reflete as profundas mudanças na sociedade e nos padrões de comportamento das comunidades. A identificação dos fatores ambientais e comportamentais que contribuem para o ganho de peso é bastante complexa, mas existem dois fatores principais que tendem a desregular os ajustes normais entre ingestão de alimentos e metabolismo que são parte da capacidade biológica de manter o balanço energético. São eles uma queda na atividade física e um superconsumo de alimentos hipercalóricos e ricos em gordura. Devido à interação entre esses dois fatores, as pessoas que exercem níveis moderadamente elevados de atividade física ao longo da vida podem ser capazes de tolerar dietas ricas em gordura, ou seja, 30 a 40% do consumo energético correspondem à gordura. Entretanto, o declínio amplamente distribuído da atividade física na maioria das sociedades, combinado à ingestão crescente de gorduras, estão associados ao aumento da proporção de indivíduos obesos. Essas observações, aliadas a estudos fisiológicos, sugerem que dietas com níveis mais baixos de gordura (cerca de 20 a 25% do consumo energético total) são necessários para minimizar o desequilíbrio energético e o ganho de peso em indivíduos e sociedades relativamente sedentários. Outros fatores, que ainda necessitam de melhor avaliação, como a densidade energética da dieta e aspectos comportamentais da alimentação, também podem contribuir com o desenvolvimento da epidemia de obesidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION TECHNICAL REPORT SERIES, 2003). Os valores de IMC, considerados como indicativos de categorias de peso corporal pela Organização Mundial de Saúde, podem ser observados na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Valores do índice de massa corporal (IMC), classificação de categorias de peso corporal e risco de comorbidade.

Categoria de peso	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidade
Abaixo do peso	$IMC < 18,5$	Baixo ¹
Peso normal	$18,5 \leq IMC < 25$	Médio
Pré-obeso (excesso de peso)	$25 \leq IMC < 30$	Aumentado
Obesidade classe I (obesidade leve)	$30 \leq IMC < 35$	Moderado
Obesidade classe II (obesidade grave)	$35 \leq IMC < 40$	Grave
Obesidade classe III (obesidade mórbida)	$IMC \geq 40$	Muito grave

¹ Existe risco aumentado de outros problemas clínicos.

Fonte: EGGER et al, 1998.

Os valores de IMC, apresentados na tabela 2.3, são independentes da idade e do sexo. Entretanto, o IMC pode não corresponder ao mesmo grau de gordura em populações diferentes, devido, em parte, a diferenças nas proporções corporais. A tabela 2.3 mostra uma relação simples entre IMC e risco de comorbidade que pode ser afetado por um grupo de fatores, incluindo a dieta, grupo étnico e nível de atividade física. Os riscos associados com o aumento do IMC são contínuos e têm início com valores menores que 25. Além do IMC, as medidas de distribuição de gordura corporal (circunferência da cintura ou razão cintura/quadril) são importantes para calcular o risco de comorbidade da obesidade.

O risco de mortalidade, relativo a todas as causas associadas à obesidade, aumenta ao longo da variação do IMC, da classe de obesidade I a III. Esse aumento é especialmente significativo quando o IMC excede 32 kg/m² e quando excede 42 kg/m² o risco de morte é de duas a seis vezes maior nos homens e duas vezes maior nas mulheres (CALLE et al., 1999). O risco de morte aumenta linearmente com o aumento da massa gorda e a diminuição da massa magra e a perda de gordura corporal está associada com a diminuição de mortalidade em decorrência de todas as causas relativas à obesidade (HEITMANN et al., 2000).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO - WESTERN PACIFIC REGION, 2000), os critérios para o diagnóstico de sobrepeso e obesidade, utilizados para populações caucasóides, podem não ser adequados para populações asiáticas e

das Ilhas do Pacífico. Enquanto que em algumas populações asiáticas a prevalência da obesidade é menor que na Europa, os riscos associados à obesidade ocorrem para valores mais baixos de IMC para as populações asiáticas. Os Polinésios representam um caso particular, pois são mais musculosos e possuem valores maiores de IMC que os europeus, mas apresentam níveis mais baixos de gordura corporal para o mesmo IMC. Com base nessas informações, a Organização Mundial de Saúde sugere uma classificação diferente para as populações asiáticas e das Ilhas do Pacífico (tabela 2.4).

Tabela 2.4. Valores do índice de massa corporal (IMC), classificação de categorias de peso corporal e risco de comorbidade para populações asiáticas.

Categoria de peso	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidade
Abaixo do peso	IMC < 18,5	Baixo
Peso normal	$18,5 \leq \text{IMC} < 23$	Médio
Pré-obeso	$23 \leq \text{IMC} < 25$	Aumentado
Obesidade classe I	$25 \leq \text{IMC} < 30$	Moderado
Obesidade classe II	IMC ≥ 30	Grave

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION WESTERN PACIFIC REGION in *The Asia-Pacific perspective: redefining obesity and its treatment*, 2000.

2.8 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

A obesidade é uma doença complexa que atinge proporções globais, com mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, sendo pelo menos 300 milhões clinicamente obesos. As proporções de obesos variam de abaixo de 5% na China, Japão e algumas nações Africanas, até acima de 75% em Samoa. Até mesmo em países de baixa prevalência como a China, em algumas cidades a proporção de obesos é quase 20% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

O aumento no consumo de alimentos calóricos, pobres em nutrientes e com níveis elevados de açúcar e gorduras saturadas, combinado à redução da atividade física, levou ao aumento da proporção de obesos em três vezes ou até mais desde 1980 em algumas áreas da América do Norte, Reino Unido, Europa Oriental, Oriente Médio, Ilhas do Pacífico, Austrália e China. A epidemia da obesidade não está restrita às sociedades industrializadas e seu aumento é, muitas vezes, mais

rápido em países em desenvolvimento que em países industrializados. Pesquisas sobre características antropométricas, em países em desenvolvimento, têm mostrado enorme variação nas prevalências de excesso de peso e obesidade em adultos. No caso do excesso de peso (POPKIN, 2002), as prevalências variam entre 11% (Índia) e 60% (Egito) e, no caso da obesidade, entre 2% (Índia) e 22% (Egito).

No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2003), estimou-se que cerca de 40% dos indivíduos adultos do País apresentam excesso de peso, ou seja, IMC igual ou maior do que 25, não havendo diferença substancial entre homens e mulheres. A prevalência do excesso de peso tende a aumentar com a idade, de modo mais rápido para os homens - 20,3% entre 20 e 24 anos, 48,3% entre 35 e 44 anos e 51,5% de 45 a 54 anos - e, de modo mais lento, porém mais prolongado, para as mulheres - 18,7% entre 20 e 24 anos, 41,4 % entre 35 e 44 anos e 57,4 % entre 55 e 64 anos. A partir dos 55 anos, para homens, e dos 65 anos, para mulheres, observa-se tendência de declínio na prevalência do excesso de peso. Dos 20 aos 44 anos de idade, o excesso de peso é mais freqüente em homens do que em mulheres, invertendo-se a situação nas faixas etárias posteriores. Entre homens, a prevalência do excesso de peso é maior nas Regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste do que nas Regiões Norte e Nordeste e, em cada uma dessas regiões, é sempre maior nas áreas urbanas do que nas áreas rurais. Entre mulheres, a prevalência do excesso de peso difere menos entre regiões e, em cada uma delas, exceto na Região Nordeste, é maior nas áreas rurais do que nas áreas urbanas. Diferenças igualmente importantes entre homens e mulheres são encontradas quanto à relação entre renda e prevalência de excesso de peso. Entre homens, a freqüência do excesso de peso aumenta de modo uniforme e intenso com a renda enquanto, entre mulheres, a relação com a renda é menos intensa, de modo que as maiores prevalências de excesso de peso são encontradas nas classes intermediárias de renda (IBGE, 2003).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE realizada entre 2002 e 2003, a obesidade, caracterizada por IMC igual ou superior a 30 kg/m^2 , afeta 8,9% dos homens adultos e 13,1% das mulheres adultas do País. Obesos representam cerca de 20% do total de homens com excesso de peso e cerca de um terço do total de mulheres com excesso de peso. O padrão de relação da obesidade

com a idade reproduz, em parte, o padrão já descrito para o excesso de peso. Da mesma forma, a distribuição regional e econômica da obesidade se aproxima da distribuição vista para o excesso de peso.

De acordo com o IBGE (2003), a tendência de evolução dos padrões de consumo alimentar, nas últimas três décadas, indica persistência de um teor excessivo de açúcar na dieta (com redução no consumo de açúcar refinado e incremento no consumo de refrigerantes) e aumento no consumo relativo de gorduras em geral e de gorduras saturadas, não evidenciando qualquer tendência de superação dos níveis insuficientes de consumo de frutas e hortaliças. Os alimentos tradicionais na dieta do brasileiro, como o arroz e o feijão, perdem importância no período, enquanto o consumo de produtos industrializados, como biscoitos e refrigerantes, aumenta em 400% (IBGE, 2003).

A evolução do perfil antropométrico-nutricional, da população adulta masculina e feminina do Brasil (figura 2.4), mostra que excesso de peso e obesidade aumentam contínua e intensamente na população masculina: a prevalência do excesso de peso mais do que duplica entre a pesquisa de 1974-1975 e a pesquisa de 2002-2003, enquanto a prevalência de obesos mais do que triplica. A evolução de excesso de peso e obesidade entre mulheres é distinta nos dois períodos demarcados pelas três pesquisas: aumentos de cerca de 50% entre 1974-1975 e 1989 e relativa estabilidade entre 1989 e 2002-2003. A prevalência do excesso de peso na população adulta brasileira em 2002-2003 revela que este problema alcança grande expressão em todas as regiões do País, no meio urbano e no meio rural e em todas as classes de rendimentos.

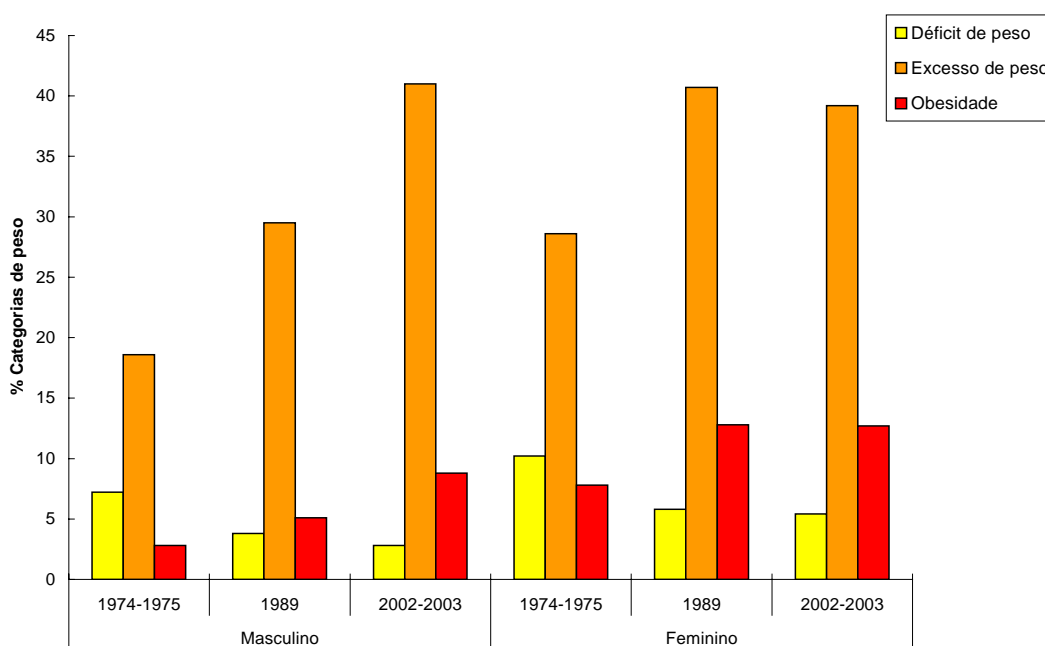


Figura 2.4. Prevalência de déficit de peso, excesso de peso e obesidade na população com 20 ou mais anos de idade, por sexo. Brasil – períodos 1974-1975, 1989 e 2002-2003, de acordo com o IBGE (2003).

2.9 GENÉTICA DA OBESIDADE

As formas comuns de obesidade são poligênicas e multifatoriais, de modo que a pressão ambiental excede a capacidade de adaptação homeostática em pessoas geneticamente predispostas, levando a um desequilíbrio energético e favorecendo a estocagem de gordura (FROGUEL et al., 2000). A epidemiologia genética da obesidade avalia a contribuição relativa dos fatores genéticos e ambientais e suas interações, na variabilidade interindividual do peso corporal. Avalia também a influência da variação dos fatores genéticos e ambientais com a idade, gênero e outros fatores. Até hoje não existe consenso a respeito do grau de herdabilidade da obesidade, provavelmente em decorrência da natureza complexa dessa doença. A estimativa do seu componente genético (herdabilidade) só pode ser realizada dentro de cada população em um ambiente específico, pois os genes de predisposição para obesidade e os alelos de cada indivíduo interagem de vários modos e com diferentes ambientes, de modo que o fenótipo final pode surgir a

partir de diferentes componentes. A maioria dos estudos, entretanto, concorda que os fatores genéticos desempenham um papel significativo nas diferenças individuais no peso corporal e na adiposidade (MAES et al., 1997; WADE et al., 2001).

Estudos de gêmeos, de famílias e de adoção fornecem a base para a epidemiologia genética da obesidade. MAES et al. (1997) revisaram esses modelos e concluíram que as estimativas de herdabilidade do IMC com base nos estudos de gêmeos (0,50 - 0,90) são geralmente mais altas que aquelas obtidas através de estudos de famílias (0,20 - 0,80) e de adoção (0,20 - 0,60). Pares de gêmeos são tão bem pareados pela idade e pelas condições ambientais que sua correlação mútua em cada característica multifatorial é geralmente maior que entre outros membros de uma família. Como a maioria das características multifatoriais varia com a idade, podendo ser influenciada por diferentes genes a diferentes idades, o uso de pares de gêmeos remove esse fator de confusão da análise.

Os genes de suscetibilidade aumentam o risco da manifestação de uma doença complexa, mas não são necessariamente requeridos para o desenvolvimento da doença. Podem apenas diminuir o limiar para a manifestação da doença complexa, exercendo um papel na complicada rede de interações com os outros fatores de predisposição.

A genética médica foi bastante beneficiada pelos estudos de mapeamento genético que permitiram a localização de genes responsáveis por muitas doenças mendelianas. A maioria das doenças e características, entretanto, não apresenta padrões simples de herança, pois diversos fatores contribuem para a manifestação das características multifatoriais, interagindo de modo complexo e tornando difícil a detecção dos genes que estão envolvidos na sua etiologia. Heterogeneidade genética pode ocorrer quando mutações em diferentes locos produzem fenótipos idênticos, por exemplo, quando tais genes estão envolvidos na mesma via bioquímica. Heterogeneidade alélica é caracterizada quando alelos diferentes do mesmo gene estão envolvidos na manifestação da mesma característica. Um alelo de predisposição pode apresentar penetrância incompleta, de modo que o indivíduo que herde tal alelo não manifeste a característica. Pode, também, ocorrer uma fenocópia se o indivíduo manifestar a característica multifatorial somente pela ação do ambiente, sem ser portador de nenhum alelo de predisposição. Existem, ainda,

algumas características multifatoriais que dependem, simultaneamente, de várias mutações em diversos genes para que o fenótipo se desenvolva. Assim, o efeito combinado de dois ou mais genes em um fenótipo não é a soma dos seus efeitos individuais, de modo que o fenótipo pode ser mensurado através de uma variável quantitativa que apresenta um limiar crítico para sua manifestação. Esse efeito de limiar ocorre quando a variável quantitativa, influenciada por vários genes, excede o limiar crítico (FALCONER, 1965).

Atualmente existem muitas abordagens diferentes para o estudo de características complexas. PERUSSE et al. (2005) revisaram publicações sobre os genes envolvidos na etiologia da obesidade, que incluem casos de obesidade monogênica, doenças mendelianas que exibem um fenótipo relevante para a obesidade humana, locos de características quantitativas (QTLs) de roedores e outros modelos animais, estudos de ligação em humanos, incluindo rastreamentos genômicos para identificar QTLs de obesidade ou de fenótipos relacionados à obesidade, estudos de ligação em humanos com genes e polimorfismos específicos. A revisão de PERUSSE et al. (2005), que inclui estudos sobre vários fenótipos relacionados à obesidade, tais como: IMC, massa de gordura corporal, percentagem de gordura corporal, gordura abdominal, massa magra, pregas cutâneas, taxas metabólicas em repouso, níveis plasmáticos de leptina e outros componentes da distribuição de gordura e balanço energético, mostra que já foram identificados locos relacionados à obesidade em todos os autossomos e no cromossomo X. Já foram identificados mais de 600 genes, marcadores e regiões cromossômicas ligados ou associados à obesidade humana (tabela 2.5). Existem 358 relatos de associações positivas relacionadas a 113 genes candidatos. Existem 49 doenças mendelianas, já relacionadas a regiões cromossômicas, nas quais a obesidade é um sinal clínico menor. Já foram descritas 69 mutações em 10 genes únicos que podem explicar os casos de obesidade patológica humana (PERUSSE et al., 2005).

As pesquisas relacionadas à obesidade foram beneficiadas pelo desenvolvimento de vários modelos animais que permitiram a melhor compreensão da complexidade subjacente ao mecanismo de balanço energético, termogênese, gordura corporal e regulação da fome e saciedade. A clonagem de genes de obesidade em roedores levou à busca desses mesmos genes, e possíveis mutações,

em humanos. Uma nova era de pesquisas relacionadas à obesidade começou nos anos 90, quando foram feitas as primeiras descobertas em roedores dos genes de obesidade *agouti* e *leptina* (LU et al., 1994; ZHANG et al., 1994), gerando grande interesse na interação entre sinais periféricos e alvos cerebrais envolvidos na regulação do balanço energético e alimentação. A tabela 2.6 sumariza as mutações em genes únicos relacionadas à obesidade em camundongos e seus homólogos em humanos.

O loco *ob* (obese) é necessário para a produção de um fator humoral de saciedade e o loco *db* (diabetes) codifica uma molécula necessária para a resposta a este fator (ZHANG et al., 1994; TARTAGLIA et al., 1995). Em camundongos, mutações no gene *ob* causam hiperfagia, obesidade mórbida precoce, hipotermia, decréscimo do gasto energético, hiperinsulinemia e infertilidade decorrente de hipogonadismo hipotalâmico. O produto do gene *ob* foi chamado de leptina (do grego *leptos* = magro), porque quando injetado em animais leva à redução da ingestão de alimento, diminuição de peso corporal e de gordura corporal, bem como à correção de todos os distúrbios metabólicos associados à obesidade (HALAAS et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995).

A leptina é sintetizada principalmente no tecido adiposo branco, mas também no epitélio gástrico e na placenta. Os níveis plasmáticos de leptina são fortemente correlacionados com o RNAm de leptina e com a massa do tecido adiposo (PELLEYMOUNTER et al., 1995). A expressão da leptina é influenciada por vários fatores e a leptina, por sua vez, tem muitos efeitos estimulantes e inibidores no eixo neuroendócrino, além do controle do peso corporal e do apetite (AHIMA e FLIER, 2000).

Tabela 2.5. Evolução do Mapa Genético da Obesidade Humana de 1994 a 2004.

	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Mutações em genes únicos				2	6	6	6	6	6	7	10
<i>Knockout</i> e transgênicos									38	55	166
Distúrbios mendelianos com localização cromossômica conhecida	8	12	13	16	16	20	24	25	33	41	49
QTLs animais	7	9	24	55	67	98	115	165	168	183	221
QTLs humanos				3	8	14	21	33	68	139	204
Genes candidatos	9	10	13	21	29	40	48	58	71	90	113

Fonte: PERUSSE et al., 2005.

Tabela 2.6 Mutações em genes únicos relacionadas à obesidade em camundongos e homólogos em humanos.

Mutações	Camundongo			Homólogo Humano		
	Cr.	Genes	Herança	Cr.	Genes	Produto Gênico
<i>Diabetes (db)</i>	4	<i>OB-R</i>	Recessiva	1p31.3	<i>LEPR</i>	Receptor de leptina
<i>Fatty liver dystrophy (fld)</i>	12	<i>Lpin1</i>	Recessiva	2p21	<i>LPIN1</i>	Lipina
<i>Fat (fat)</i>	8	<i>Cpe</i>	Recessiva	4q32	<i>CPE</i>	Carboxipeptidase E
<i>OLETF</i>	5	<i>Cckar</i>	Recessiva	4p15.2– p15.1	<i>CCKAR</i>	Receptor A de colecistocinina
<i>Little</i>	11	<i>Gh</i>	Recessiva	8q12.3	<i>GH</i>	Hormônio de crescimento
<i>Obese (ob)</i>	6	<i>Ob</i>	Recessiva	7q31.3	<i>LEP</i>	Leptina
<i>Tubby (tub)</i>	7	<i>Tub</i>	Recessiva	11p15.5	<i>TUB</i>	Proteína sinalizadora de insulina
<i>Mahoganoid (md)</i>	2	<i>Atrn</i>	Recessiva	20p13	<i>ATRNL</i>	Atractina
<i>Mahogany (mg)</i>	16	<i>Mgm1</i>	Recessive	16p13.3	<i>MGRN1</i>	Mahogunina, <i>ring finger 1</i>
<i>Agouti yellow (A^y)</i>	2	<i>A^y</i>	Dominante	20q1.2 – q12	<i>ASIP</i>	Proteína sinalizadora agouti

Cr.= cromossomo

Fonte: PERUSSE et al., 2005.

O gene do receptor da leptina (*OB-R*) foi isolado em camundongos *db/db* que apresentam fenótipo similar aos camundongos *ob/ob*, além de apresentarem insensibilidade à leptina. *OB-R* é membro da superfamília de receptores de citocina de classe I. Em mamíferos, duas isoformas predominantes de *OB-R* foram descritas: forma curta (*OB-RS*) amplamente expressa no organismo, e forma longa (*OB-RL*), com um padrão de expressão mais restrito que inclui o núcleo hipotalâmico, importante para a regulação do peso corporal. Existe evidência de que a isoforma curta, *OB-RS*, possa estar envolvida com o transporte e eliminação da leptina, entretanto, sua função precisa permanece desconhecida. A isoforma *OB-RL* é um receptor de sinalização que transduz o sinal e induz a transcrição dos genes controlados pela leptina. A mutação *db* no gene *OB-R* impede a transcrição da isoforma longa, *OB-RL* e, portanto, sua ação como receptor hipotalâmico (WHITE, 2000).

A estratégia utilizada para identificar formas não sindrômicas de obesidade tem sido bem sucedida. Essa estratégia é baseada em estudos com grande número de indivíduos com mutações em genes candidatos, que são homólogos a genes de roedores, sabidamente envolvidos na regulação energética e que, quando mutados, causam obesidade em roedores. Em apenas dois anos, cinco diferentes genes de obesidade humana foram identificados: leptina (*LEP*), receptor de leptina (*LEP-R*), pro-opiomelanocortina (*POMC*), receptor de melanocortina 4 (*MC4R*), e convertase 1 (*PCSK1*). Todos os produtos, codificados por esses cinco genes, são parte da mesma via de regulação da ingestão de alimentos (FROGUEL E BUTIN, 2001). De acordo com SNYDER et al. (2004) existem sete genes envolvidos no desenvolvimento monogênico não sindrômico de obesidade humana: receptor de leptina (*LEPR*, 1p31.3); pro-opiomelanocortina (*POMC*, 2p24.1); pró-proteína convertase 1 (*PCSK1*, 5q15); leptina (*LEP*, 7q32.2); receptor de melanocortina 4 (*MC4R*, 18q21.32); receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*PPARG*, 3p25.2) e sub-unidade regulatória 3 da proteína fosfatase 1 (*PPP1R3A*, 7q31.2).

O gene *LEP* codifica um hormônio (leptina) sintetizado e secretado pelos adipócitos proporcionalmente ao seu conteúdo de gordura. No hipotálamo (FROGUEL E BUTIN, 2001), a leptina se liga à forma longa do seu receptor

(codificado pelo gene *LEPR*) e, entre seus efeitos, está o aumento da expressão do gene *POMC*. A enzima convertase 1 (produto de gene *PCSK1*) quebra o POMC originando ACTH e hormônio estimulante de α -melanócito (α -MSH), que reduz a ingestão de alimentos quando se liga ao receptor de melanocortina 4 (MC4R).

O gene *PPARG* é altamente expresso nos adipócitos e a sub-unidade regulatória 3 da proteína fosfatase (gene *PPP1R3A*) é a sub-unidade regulatória músculo-específica da proteína fosfatase 1. Os produtos de ambos os genes estão envolvidos na regulação do metabolismo de carboidratos (*PPP1R3A*) e lípidos (*PPARG*). SAVAGE et al. (2002) analisaram os dois genes em indivíduos de uma mesma família, na qual todos os membros com sobrepeso, obesidade e resistência à insulina eram heterozigotos duplos para mutações de codon de ponto final prematuro nos genes *PPARG* e *PPP1R3A*. Dois membros afetados de uma outra família eram portadores apenas da mutação no gene *PPP1R3A*, sugerindo que outros genes podem estar envolvidos na manifestação do fenótipo. Essas moléculas resultantes de mutações, envolvidas no metabolismo de carboidratos e lípidos, podem fornecer um modelo de interações entre genes que pode servir de base para o entendimento de distúrbios metabólicos comuns como o diabetes do tipo 2 e a obesidade.

A maioria das formas sindrômicas da obesidade, como Prader-Willi (15q11.2), Cohen (8q22.2), Alstrom (2p13.1), Bardet-Biedl (11q13.1) e síndromes de resistência à insulina (19p13.3) foram mapeadas, mas, embora tenham sido identificados genes candidatos, os genes responsáveis ainda não foram isolados, pois a raridade dessas mutações torna difícil a busca por esses genes. Atualmente existem 49 síndromes mendelianas, nas quais a obesidade é um traço fenotípico, com localização cromossômica já estabelecida (PERUSSE et al., 2005).

Estudos em animais são ferramentas poderosas para a análise genética de características complexas. Cruzamentos experimentais de camundongos e ratos permitem a análise de centenas de meioses a partir de um único conjunto de pais, removendo, portanto, o problema de heterogeneidade genética e permitindo a análise de interações genéticas muito mais complexas que em estudos com humanos. A principal vantagem dos modelos animais é permitir a decomposição de características quantitativas em fatores genéticos discretos, permitindo a detecção

de genes que interagem em características de QTLs (LANDER e SCHORK, 1994). Os estudos com camundongos *Knockout* e transgênicos, que vêm apresentando grande impulso nos últimos dois anos, têm fornecido ampla evidência de genes envolvidos em fenótipos relacionados à obesidade. De acordo com PERUSSE et al. (2005) existem 166 genes envolvidos com a obesidade identificados através de camundongos *Knockout* e transgênicos que apresentam um equivalente humano (tabela 2.5).

Os estudos de associação levam em conta diversos fenótipos relacionados à obesidade: peso corporal; IMC; sobrepeso; obesidade; massa gorda; pregas cutâneas; gordura abdominal visceral; circunferência da cintura; razão cintura/quadril; diâmetro sagital; demanda energética em repouso; efeito térmico da alimentação; oxidação de lípidos em 24 horas; tamanho dos adipócitos e lipólise; níveis plasmáticos de leptina; mudanças no peso corporal e adiposidade ao longo do tempo; respostas a programas de perda de peso baseados no estilo de vida e alterações na composição corporal ao longo de provas de resistência física (PERUSSE et al., 2005).

O rastreamento amplo de genomas é bastante utilizado quando não há informação *a priori* a respeito da patogênese da doença, ou, quando o objetivo do estudo é encontrar novos locos que contribuem para o fenótipo. O princípio do rastreamento amplo de genomas é utilizar um grande número de marcadores altamente polimórficos igualmente espaçados, calcular a ligação para cada posição ao longo do genoma, e, finalmente, identificar as regiões nas quais existe um desvio significativo daquilo que seria esperado por segregação independente. Os estudos de ligação, utilizando rastreamentos genômicos, vêm aumentando significativamente nos últimos anos e, atualmente, existem 139 QTLs humanos identificados através desses estudos (tabela 2.5).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.1.1 - Investigar parte da variabilidade molecular e fenotípica da butirilcolinesterase em amostras de obesos e não obesos doadores de sangue de Curitiba/PR (HEMEPAR), buscando associações entre BChE e obesidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 - Investigar a variabilidade de partes do gene *BCHE* (três segmentos da região regulatória a montante, que contém o sítio de iniciação de transcrição; exon 1; três segmentos do exon 2 e parte do exon 4) em amostras de indivíduos obesos ($IMC \geq 30$) e de peso normal ($20 \leq IMC < 25$) doadores de sangue de Curitiba.

3.2.2 - Investigar a associação entre a variabilidade detectada do gene *BCHE* e variáveis antropométricas associadas à obesidade.

3.2.3 - Analisar a atividade da BChE na amostra de obesos e não obesos, buscando relacioná-la às variações do gene *BCHE* dentro de cada grupo e entre os dois grupos (obesos e não obesos).

3.2.4 - Analisar a variabilidade do loco *CHE2* na amostra de indivíduos obesos e não obesos, buscando relacionar os resultados obtidos com algumas variáveis antropométricas (peso, altura e IMC) desses indivíduos e com os resultados de atividade enzimática. As análises serão efetuadas dentro de cada grupo e entre os dois grupos.

3.2.5 - Delinear o perfil epidemiológico da obesidade em uma amostra de doadores de sangue de Curitiba/PR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

A amostra total de doadores de sangue ($N = 2953$) foi utilizada para análises relativas à epidemiologia da obesidade. Essa amostra inclui homens (79,9%) e mulheres (20,1%), Euro-brasileiros (97%), Afro-brasileiros (2,8%) e asiáticos (0,2%), contando com 241 homens euro-brasileiros obesos, pertencentes às categorias de obesidade leve, grave e mórbida.

No que se refere às análises da butirilcolinesterase, foram selecionadas duas amostras de doadores de sangue: obesos e controles. As amostras de obesos ($N = 153$; $IMC \geq 30$) e controles ($N = 153$; $20 \leq IMC < 25$), utilizadas nesse estudo e pareadas por idade, se referem a homens euro-brasileiros. Os obesos foram selecionados da amostra maior ($N = 2953$), incluindo-se todos aqueles com obesidade mórbida ($IMC \geq 35$). Nos 241 obesos da amostra total a frequência de obesos leves, graves e mórbidos é de 87,6%, 9,5% e 2,9%, respectivamente. Nos 153 obesos da amostra utilizada para as análises da BChE, os obesos leves, graves e mórbidos são encontrados com frequências de 80,4%, 15,0% e 4,6%, respectivamente (figura 4.1). Os 153 obesos componentes da amostra desse estudo foram selecionados por permitirem um pareamento de idade com seus controles de peso normal.

As proporções de categorias de peso na amostra total de doadores de sangue podem ser observadas na figura 4.2. Dentre os obesos, 84,8% são leves, 12,3% são graves e 2,9% mórbidos.

As figuras 4.3 e 4.4 mostram, respectivamente, as curvas de IMC e de idade na amostra de obesos e na amostra controle do presente estudo.

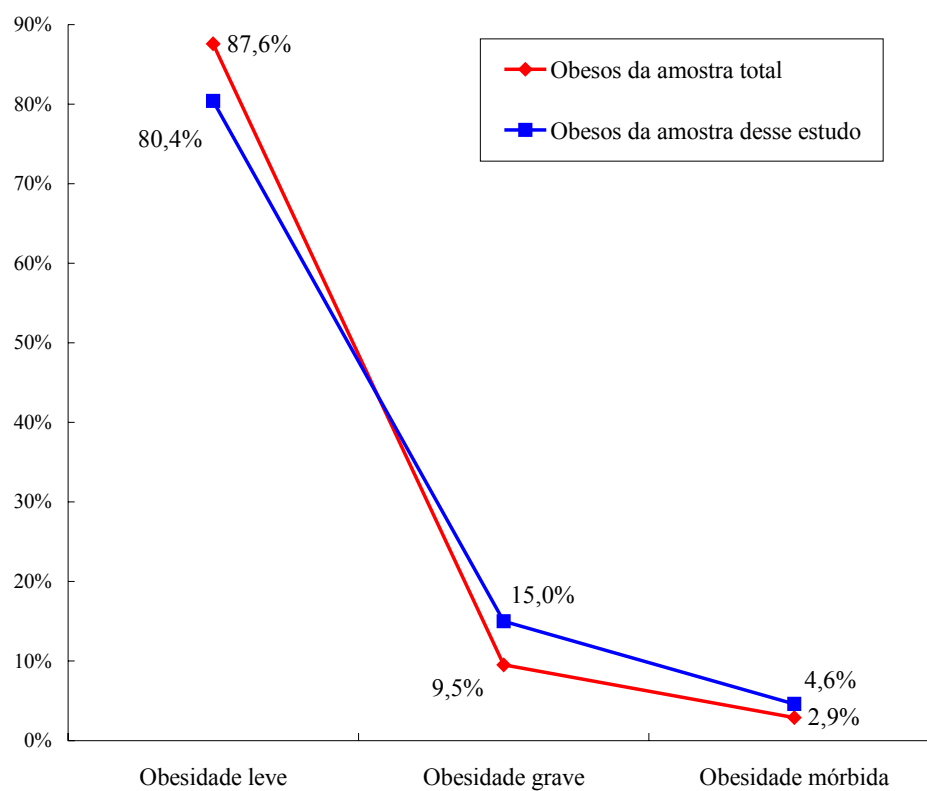


Figura 4.1. Distribuição de indivíduos classificados como obesos leves ($30 \leq \text{IMC} < 35$), graves ($35 \leq \text{IMC} < 40$) e mórbidos ($\text{IMC} \geq 40$), na amostra total de homens Euro-brasileiros e na amostra desse estudo.

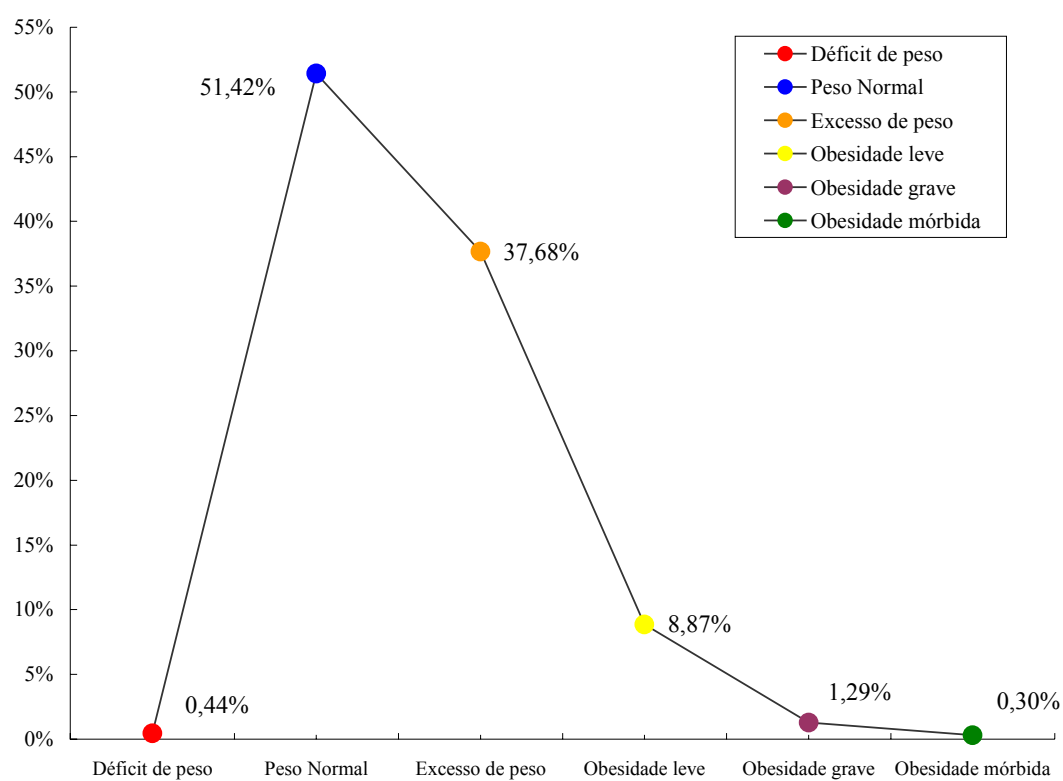


Figura 4.2. Percentagem de indivíduos, por categoria de IMC de acordo com a OMS, na amostra total de 2953 doadores de sangue.

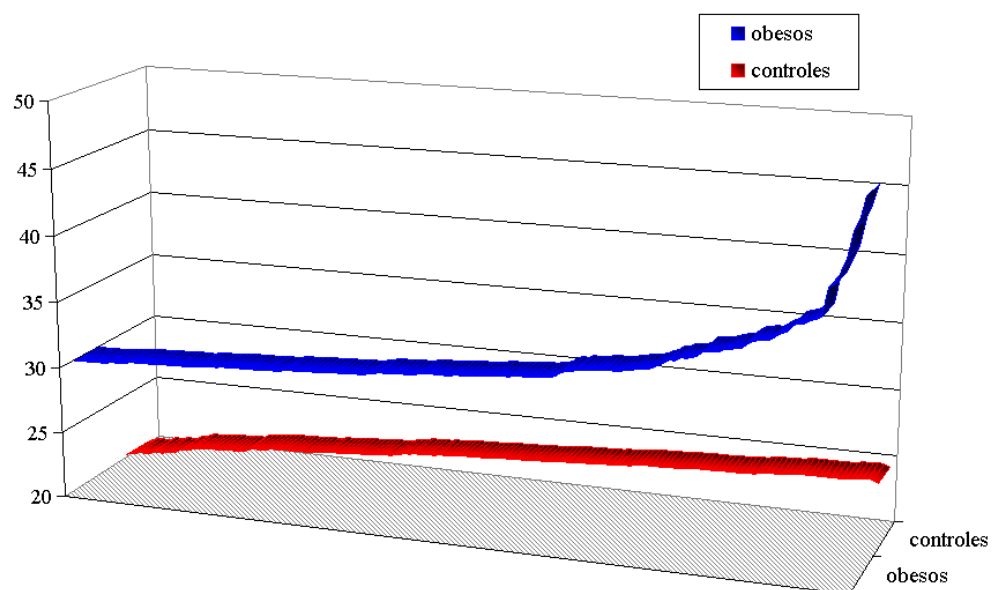


Figura 4.3. Distribuição de IMC na amostra de obesos ($N = 153$) e na amostra controle ($N = 153$).

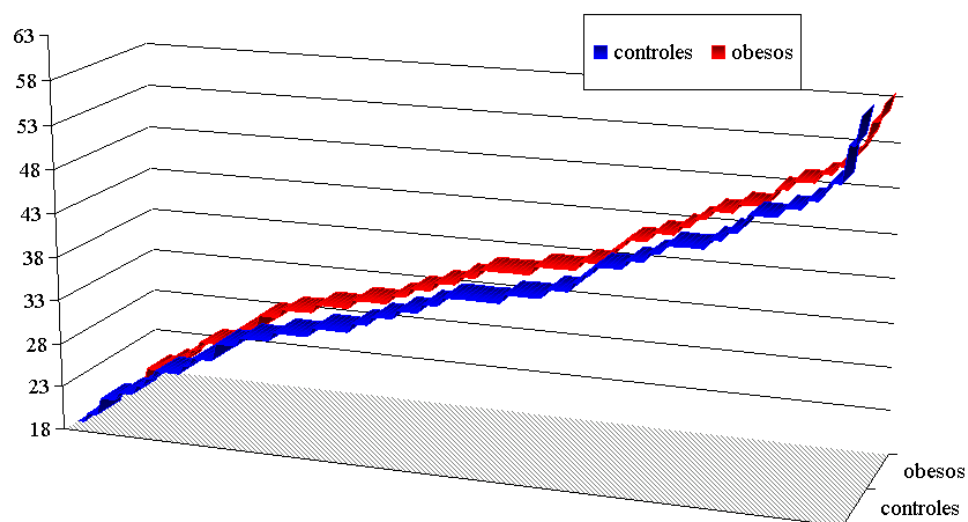


Figura 4.4. Distribuição de idade na amostra de obesos ($N = 153$) e na amostra controle ($N = 153$).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Aspectos Gerais

Para todas as análises realizadas nesse estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico, que haviam sido coletadas com EDTA e que estavam estocadas em congelador a -20°C .

4.2.2 Medida de atividade da BChE

Para a determinação da atividade da BChE foi utilizada a técnica de DIETZ et al. (1972), modificada por EVANS e WROE (1978), cujo princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A dosagem do produto formado é realizada em espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25°C .

O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) é preparado pela mistura de duas soluções “a” e “b” até a obtenção do pH adequado. A solução “a” contém 4,73 g de Na_2HPO_4 anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” contém 13,61 g de KH_2PO_4 anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada.. O DTNB (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, e 0,25 mL de soro (1/100 em água destilada) devem ser mantidos por três minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro. Após os três minutos deve ser adicionado 0,05 mL de substrato e iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A0, deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, deve ser calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade

(KU/L), Δ /minuto é multiplicado pelo fator 73,53 e por 1.000.

4.2.3 Eletroforese em gel de ágar – Fenotipagem do loco *CHE2*

Esta técnica foi desenvolvida por ROBINSON et al (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina e posteriormente, foi modificada por VAN ROS E VERVOORT (1973) para aplicação dessa técnica à BChE. Adaptações subseqüentes foram introduzidas por FADEL PICHETH (1991) e SOUZA (1995).

O gel de ágar é preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). Esta solução é aquecida por cerca de sete minutos ou até que o ágar seja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento a solução é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosmose. Após esse período de repouso as amostras de plasma são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 μ L de plasma ou soro. A placa contendo as amostras é então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 nas cubas, por três horas e meia (a 4°C; 75 V e 35 mA). Após a corrida eletroforética despeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato é preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na₂HPO₄, 0,2 M e 330 mL de NaH₂PO₄, 0,2 M) e solução de α -naftilacetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37°C. Após a revelação das bandas a placa é lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem. A folha de papel filtro deve ser trocada após 10 minutos para retirar o excesso de umidade.

4.2.4 Extração do DNA (Lahiri e Nurnberger, 1991)

Esta técnica consiste na separação, a partir do sangue periférico, do creme de leucócitos de onde será extraído DNA. Foram coletados 10 mL de sangue em EDTA e o creme de leucócitos, acrescido de suspensão de hemácias, foi estocado a -20°C . Desse material descongelado foi retirado o creme de leucócitos, que foi ressuspenso em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl_2 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 μL de IGEPAL CA-630. Após centrifugar a 2500 rpm por 15-20 minutos, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 10 mL com TKM1. Repetir a centrifugação e a ressuspensão em TKM1 até que o precipitado fique bem claro. Ressuspender delicadamente o precipitado, adicionar 800 μL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; MgCl_2 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) e agitar bem. Adicionar 50 μL de SDS 10% e misturar. Incubar em banho-maria a 55°C durante a noite. Retirar do banho-maria e adicionar 300 μL de NaCl saturado (6 M) e misturar bem. Centrifugar a 1200 rpm por 10-20 minutos, passar o sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionar dois volumes de etanol 100%, gelado, tampar o tubo com parafilme e invertê-lo várias vezes (delicadamente) até precipitar o DNA. Pescar o DNA utilizando micropipeta com ponteira de ponta cortada e colocar em tubo de 1,5 mL. Lavar o DNA obtido com etanol 70%, dispensando posteriormente o álcool. O tubo é mantido semi-aberto na estufa a 37°C , até evaporar todo o álcool. Ressuspender o DNA em 200 μL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e deixar no banho-maria a 55°C por uma hora. Após três dias na geladeira, verificar a densidade ótica e congelar.

4.2.5 PCR-SSCA

A técnica de PCR-SSCA (polymerase chain reaction - single strand conformational analysis) consiste na amplificação da sequência de DNA que se pretende analisar e posterior desnaturação do produto amplificado que é, então, submetido à eletroforese para a análise de conformação de DNA em fita simples. Essa técnica permite a detecção de alterações no DNA ainda desconhecidas e que podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto, sendo detectadas pela

modificação do comportamento eletroforético do DNA em fita simples. Foram analisadas as seguintes regiões do gene *BCHE*: 3 segmentos da região regulatória a montante, que contém o sítio de iniciação de transcrição; exon 1; 3 segmentos do exon 2 e exon 4. A tabela 4.1 mostra os pares de iniciadores utilizados para cada um dos oito segmentos do gene *BCHE* analisados. As figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 são representações esquemáticas, indicando a posição dos pares de iniciadores utilizados, da região regulatória a montante do gene *BCHE*, exon 1, exon 2 e exon 4, respectivamente.

Para cada par de iniciadores, foi utilizada uma amostra de 1 µL (10 ng) de DNA genômico purificado, misturada a 9 µL de Supermix (Invitrogen) e a 10 pmoles de cada iniciador. Os ciclos, que são os mesmos para os oito pares de iniciadores utilizados nesse estudo, foram programados do seguinte modo para o MJ Research PTC-100: 1) 80°C /min.; 2) 94°C /min.; 3) 48°C /min.; 4) 72°C /min.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C /10 min. Após a amplificação, 5 µL do produto foram misturados a 6 µL de corante SSCA (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 µL de EDTA - 0,4 M -, 16,7 µL de NaOH 3 M e 108,3 µL de água bidestilada) e depois mantidos a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. A solução estoque de poliacrilamida 30% contém 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol (100%) e água bidestilada em quantidade suficiente para completar 100 mL. A solução estoque de poliacrilamida 50% contém 49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol (100%) e água bidestilada em quantidade suficiente para completar 100 mL.

Tabela 4.1. Pares de iniciadores utilizados para cada um dos oito segmentos do gene *BCHE*.

Pares de Iniciadores	Seqüências	Nucleotídeos	Produtos amplificados	Referências
PROF1	5'AGC TGC TGC TGT AAG TTG AG 3'	nt 2 a nt 152 ¹	151 pb (RR1)	Presente estudo
PROR1	3' CCA CCT TCT GTT ACT GTC CC 5'			
PROF2	5'CAT CAT GTA TGA CTG CCT GC 3'	nt 1737 a nt 1923 ¹	187 pb (RR2)	Presente estudo
PROR2	3' GAA AAT AAG AAA CAC AAT GC 5'			
PROF3	5' AAT TGT AAA GCA TGA ATC CTG 3'	nt 2179 a nt 2354 ¹	176 pb (RR3)	Presente estudo
PROR3	3' CCA GCC TGT AAA TTG GAC TG 5'			
E1F	5'CTG CTG CCA ACT CTC GCG AG3'	nt -268 ao nt 27 da ext. 5' do intron 1	203 pb (exon 1)	Presente estudo
E1R	3'CGA AGG TGT AAA TTC AGA GC 5'			
N 25	5' GGT CTG ATA TTT GGA ATG 3'	nt 155 a nt 347	193 pb (exon 2)	SOUZA et al., 2005b
N 23	3' CCA CCA TAA ATC CAT ATC 5'			
P25	5'CC ATT CTG CAA AGT GGA TCC 3'	nt 659 a nt 876	218 pb (exon 2)	SOUZA et al., 2005b
N53	3' CGG ACC AAA GTT TAC TGA 5'			
N75	5' GCT CCT GGC TTC AGC AAA 3'	nt 1000 a nt 1235	236 pb (exon 2)	SOUZA et al., 2005b
N73	3' CAT TCT GAG AAC TTC TTG 5'			
P43	5' TGA TTA ATA CAA CTT ATT CC 3'	nt -31 da ext. 3' do intron 3 a nt 1758 do exon 4	189 pb (exon 4)	SOUZA et al., 1998
P45	3' GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG 5'			

¹ Ver figura 4.5 para explicação a respeito da numeração dos nucleotídeos da região regulatória à montante do gene *BCHE*.

REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE *BCHE*

PROF1

1 cagctgctgc tgtaagttga gccacaagga agaaactcta agacaggaag aataaatgct ttagagggtgc actaaaataa tgaatgaact

91 aatgtggcat agctgtgaaa tcatgcgagg aaaagaacta cagggacagt aacagaaggt gg

PROR1

1681 ttggtgaagg ttattcattt tatttttctt gtcttgacca gaaaattgtg gtttct

PROF2

1771 aggaaattac caatgctgaa atttgtatga cttaaataag tgttgaagtg tggggggtga aaggagatac atatcagaga catccattca

1861 gttaatagaa ctaagttttt gatttgcata gcttatatct agagcattgt gtttcttatt ttc

PROR2

2161 tcttagaaga ctacctgca

PROF3

2251 cagatttcaa gttgctgctg ccaactctcg cgagctttgt c

PROR 3

2338 TCC AAT TTA CAG GCT GGA GCA GCA GCT GCA TCC

Figura 4.5. Representação esquemática da região regulatória a montante do gene *BCHE*, indicando os três fragmentos amplificados (**em vermelho**) e a região dos três pares de iniciadores utilizados nesse estudo (**em azul**). Em **marrom** está indicado o sitio de início da transcrição (início do exon 1). O primeiro códon do exon 1, que não codifica o peptídeo maduro, está indicado em **verde**. Como a numeração proposta nesse estudo corresponde àquela proposta por ARPAG AUS et al. (1990), na qual o nucleotídeo +1 está localizado no exon 2, correspondendo ao primeiro nucleotídeo do peptídeo maduro, os nucleotídeos da região promotora foram numerados (coluna da esquerda) apenas para permitir a localização dos produtos amplificados.

FINAL DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE BCHE, EXON 1 E INÍCIO DO INTRON 1

-293 agcctctgaa cagatttcaa gttgctgctg ^{E1F} ccaactctcg cgagctttgt c^Agtaacagt tgattgttac attcagtaac actga ATG

-205 TCA GTG CAG TCC AAT TTA CAG GCT GGA GCA GCA GCT GCA TCC TGC ATT TCC CCG AAG TAT TAC ATG ATT TTC

-131 ACT CCT TGC AAA CTT TGC CAT CTT TGT TGC AGA GAA TCG G ↑ gtaagttgct ^{E1R} ctgaatttac accttcgtgta

EXON 1 INTRON 1

Figura 4.6. Representação esquemática do final da região regulatória do gene *BCHE*, exon 1 e início do intron 1, indicando o fragmento amplificado (**vermelho**) e a região dos iniciadores (**em azul**) utilizados nesse estudo. Em **marrom** está indicado o sitio de início da transcrição (início do exon 1). O primeiro códon do exon 1, que não codifica o peptídeo maduro, está indicado em **verde**. A seta indica o final do exon 1 e o início do intron 1. Os nucleotídeos da região promotora e do exon 1 foram numerados (coluna da esquerda) de acordo com a numeração proposta por ARPAG AUS et al. (1990), na qual o nucleotídeo +1 está localizado no exon 2, correspondendo ao primeiro nucleotídeo do peptídeo maduro.

PARTE DO EXON 2

+1 **G**AA GAT GAC ATC ATA ATT GCA ACA AAG AAT GGA AAA GTC AGA GGG ATG AAC TTG ACA GTT TTT GGT GGC ACG GTA

76 ACA GCC TTT CTT GGA ATT CCC TAT GCA CAG CCA CCT CTT GGT AGA CTT CGA TTC AAA AAG CCA CAG TCT CTG ACC

N25

151 AAG TGG TCT GAT ATT TGG AAT GCC ACA AAA TAT GCA AAT TCT TGC TGT CAG AAC ATA GAT CAA AGT TTT CCA GGC

226 TTC CAT GGA TCA GAG ATG TGG AAC CCA AAC ACT GAC CTC AGT GAA GAC TGT TTA TAT CTA AAT GTA TGG ATT CCA

N23

301 GCA CCT AAA CCA AAA AAT GCC ACT GTA TTG ATA TGG ATT TAT GGT GGT GGT TTT CAA ACT GGA ACA TCA TCT TTA

.....

P25

634 GGA AGC CAT TCA TTG TTC ACC AGA GCC ATT CTG CAA AGT GGA TCC TTT AAT GCT CCT TGG GCG GTA ACA TCT CTT

709 TAT GAA GCT AGG AAC AGA ACG TTG AAC TTA GCT AAA TTG ACT GGT TGC TCT AGA GAG AAT GAG ACT GAA ATA ATC

784 AAG TGT CTT AGA AAT AAA GAT CCC CAA GAA ATT CTT CTG AAT GAA GCA TTT GTT GTC CCC TAT GGG ACT CCT TTG

N53

859 TCA GTA AAC TTT GGT CCG ACC GTG GAT GGT GAT TTT CTC ACT GAC ATG CCA GAC ATA TTA CTT GAA CTT GGA CAA

.....

N75

991 GTC TAT GGT GCT CCT GGC TTC AGC AAA GAT AAC AAT AGT ATC ATA ACT AGA AAA GAA TTT CAG GAA GGT TTA AAA

1066 ATA TTT TTT CCA GGA GTG AGT GAG TTT GGA AAG GAA TCC ATC CTT TTT CAT TAC ACA GAC TGG GTA GAT GAT CAG

1141 AGA CCT GAA AAC TAC CGT GAG GCC TTG GGT GAT GTT GTT GGG GAT TAT AAT TTC ATA TGC CCT GCC TTG GAG TTC

N73

1216 ACC AAG AAG TTC TCA GAA TGG GGA AAT AAT

Figura 4.7. Representação esquemática de parte do exon 2 do gene *BCHE*, indicando os fragmentos amplificados (**vermelho**) e a região dos iniciadores (**em azul**) utilizados nesse estudo. Em **verde** está indicado o primeiro nucleotídeo que codifica o peptídeo maduro.

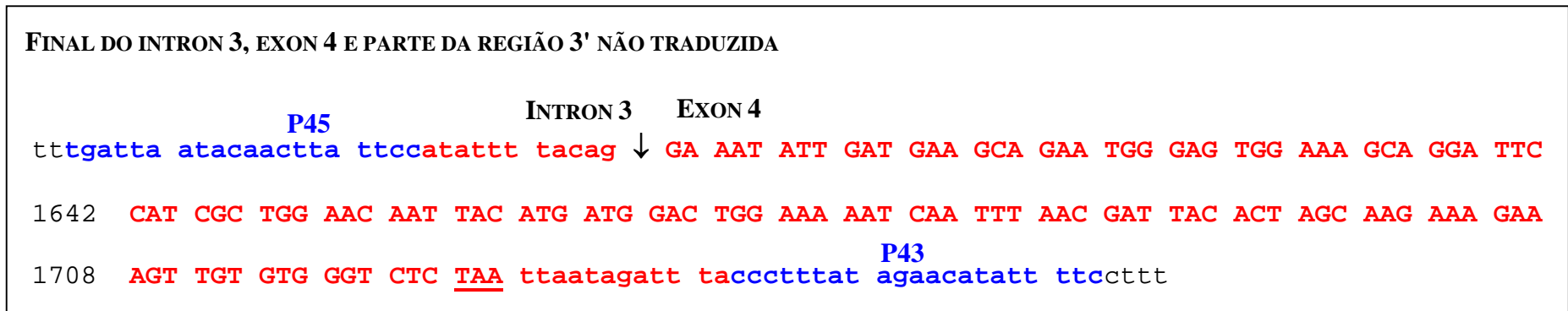


Figura 4.8. Representação esquemática de parte do intron 3, exon 4 e início da região 3' não traduzida do gene *BCHE*, indicando o fragmento amplificado (**vermelho**) e a região do par de iniciadores (**em azul**) utilizados nesse estudo. A seta indica o final do intron 3 e o início do exon 4. A trinca sublinhada marca o início da região 3' não traduzida.

A concentração final de poliacrilamida (acrilamida + bisacrilamida) no gel é chamada de T e a concentração de bisacrilamida no total de poliacrilamida da solução estoque é denominada C. Um tipo de gel é preparado com TBE 1x (diluído a partir de TBE 5x: 54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 e água destilada em quantidade suficiente para completar 1000 mL) e o outro tipo, com tampão ácido (Tris-HCl 33mM, pH 4,6). O tampão utilizado na cuba é TBE 1x. A tabela 4.2 mostra as condições de eletroforese para cada segmento analisado do gene *BCHE*.

A revelação do gel é realizada em etapas, durante as quais o gel deve ser mantido em agitação. Após a eletroforese, o gel deve ser colocado em um recipiente e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1 %) durante três minutos. Após duas lavagens com água destilada, o gel é imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) por 20 minutos. Depois de duas novas lavagens com água destilada, o gel é imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96 % e 92 µL de formaldeído) até que o líquido escureça. Depois da retirada do líquido escurecido, deve ser acrescentado o restante da solução reveladora e o gel mantido imerso até que as bandas de DNA apareçam no gel. Quando a revelação estiver terminada, lavar o gel duas vezes com água destilada e mantê-lo em solução de ácido acético (10 %) por cinco minutos. Lavar por duas vezes o gel com água destilada e acrescentar solução aquosa de glicerol (5 %), na qual o gel deve ser mantido por pelo menos dez minutos.

A secagem do gel pode ser realizada logo após o término da revelação e consiste em preparar o gel para um secador a vácuo que permite o armazenamento do gel sem que se quebre ou que ocorra perda de coloração. O gel deve ser embebido em solução de metanol (30 %) e glicerol (5 %) e colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução. O gel, depois de completamente seco, pode ser guardado, por tempo indeterminado, sem que ocorra perda de coloração.

Tabela 4.2. Condições de eletroforese para os segmentos do gene *BCHE* analisados nesse estudo.

Condições ¹	Segmento do gene <i>BCHE</i>					
	RR ²	Exon 1	Exon 2 ³	Exon 2 ⁴	Exon 2 ⁵	Exon 4
Tampão do gel	21 mL (pH = 4,6)	23,4 mL (pH = 4,6)	23,4 mL (TBE 1x)	21 mL (TBE 1x)	21 mL (TBE 1x)	22 mL (TBE 1x)
Acrilamida ⁶	9 mL (30%)	6,6 mL (50%)	6,6 mL (50%)	9 mL (30%)	9 mL (30%)	8 mL (30%)
Eletroforese (250V/35mA)	4 horas	7 horas	7 horas	6 horas	6 horas	5 horas

¹ O tampão de cuba é TBE 1x para todas as eletroforeses. ² Os três fragmentos da região regulatória (RR1, RR2 e RR3) foram analisados com as mesmas condições de eletroforese. Parte da amostra (ver tabela 5.13) foi submetida a um segundo tipo de eletroforese, sob as mesmas condições descritas para o fragmento amplificado por N 25 e N 23. ³ Iniciadores N 25 e N 23 ⁴ Iniciadores P 25 e N 53. ⁵ Iniciadores N 75 e N 53. ⁶ Valores de T e concentração da solução estoque de poliacrilamida entre parênteses.

4.2.6 Seqüenciamento

Foram utilizados dois diferentes pares de iniciadores (E1F e E1R; PROF3 e E1R) para PCR pré-seqüenciamento. A reação de PCR pré-seqüenciamento, é semelhante àquela descrita no item 4.2.5, exceto pela quantidade de iniciadores. Para cada par de iniciadores, cujos produtos foram posteriormente seqüenciados, foram utilizados 5 pmol de cada iniciador (correspondendo à metade da quantidade de iniciadores utilizada nas reações de PCR para as análises de SSCA) e 1 µL de DNA. Os demais reagentes utilizados na reação de PCR pré-seqüenciamento são os mesmos já descritos anteriormente (item 4.2.5). Os ciclos são os mesmos para os dois pares de iniciadores utilizados no seqüenciamento e foram programados do seguinte modo para o MJ Research PTC-100: 1) 80°C /min.; 2) 94°C /min.; 3) 48°C /min.; 4) 72°C /min.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C /10 min. Para sua purificação, o material amplificado foi misturado com 2/3 do volume de acetato de amônio (7,5 M) e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto. Após 10 minutos, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos e, subsequente, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em 250 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. Depois de descartado o sobrenadante e de bem seco o precipitado, este foi ressuscitado em 15 µL de TE. Para determinação do volume a ser utilizado na reação de seqüenciamento, o DNA foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 2%, via comparação com o padrão de massa molecular (low DNA MASS Ladder – Gibco BRL). Foram aplicados no gel de agarose 2 µL de corante xilenocianol (tris 50 mM pH 7,6, EDTA 5 M, SDS 5%, xileno cianol 0,1%, sacarose 28%) e 2 µL de cada amostra, procedendo-se a corrida eletroforética por 50 minutos a 80 V. O gel foi corado com brometo de etídeo durante 15 minutos. A reação de seqüenciamento foi realizada com 4 µL da mistura de reação do *kit* Big Dye Terminator Cycle Kit, de 1 a 5 µL de DNA (entre 30 e 90 ng) e 1 µL de cada iniciador (10 pmoles), em 35 ciclos das seguintes etapas: 90°C por 30 seg., 48°C por 60 seg. e 60°C por 6 min. em um termociclador MJ Research PTC-100. Após a reação de seqüenciamento, são acrescentados a cada amostra 2 µL de acetato de amônio 7,5 M, 10 µL de água ultrapura e 65 µL de etanol absoluto. A mistura, depois de homogeneizada, foi

mantida em repouso por 10 minutos e em seguida centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos. Após descartar o sobrenadante, as amostras foram lavadas com 250 µL de etanol 70% e novamente centrifugadas a 14.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi subseqüentemente descartado e as amostras, depois de bem secas, foram submetidas à leitura da seqüência de DNA, através de seqüenciador automático (ABI Prism 377; Applied Biosystems Inc.). As análises dos eletroferogramas foram feitas com o programa BioEdit (HALL, 1999). A seqüência utilizada como referência para a identificação de variação foi aquela descrita por JIBILO et al. (1994).

4.2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas, relativas aos cálculos de frequências fenotípicas, alélicas e genotípicas, teste t, teste F, análises de correlação e testes de χ^2 , foram realizadas com o programa Statistica para Windows (Statsoft, Inc., 1996).

O programa Arlequin versão 2.0 (SCHNEIDER et al., 2000) foi utilizado para o cálculo das frequências haplotípicas, dos valores de D e D' e testes de χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos haplótipos.

Os gráficos foram elaborados com o programa Microsoft Excel 2000.

5 RESULTADOS

5.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

5.1.1 Amostra total de doadores de sangue

A análise da distribuição das categorias de IMC na amostra total de doadores de sangue (N = 2953) mostra que existe diferença significativa quando se comparam homens e mulheres ($\chi^2_{(4)}=19,75$; $p < 0,006$; figura 5.1).

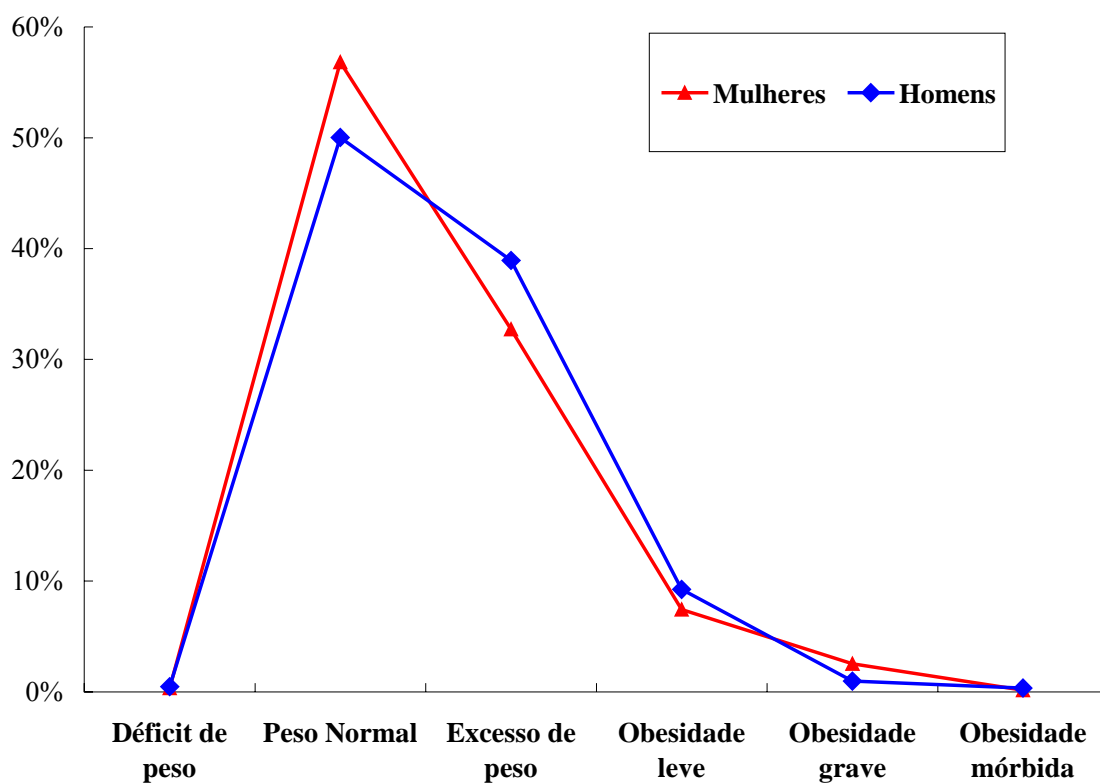


Figura 5.1. Percentagens de homens e mulheres por categoria de IMC, de acordo com a OMS, em amostra de 2953 doadores de sangue de Curitiba.

Nessa amostra existem 56,8% de mulheres com peso normal ($20 < \text{IMC} < 25$) e 32,7% com excesso de peso ($25 \leq \text{IMC} < 30$). Entre os homens, são 50% com peso normal e 38,9% com excesso de peso. A comparação dos dois sexos, quando classificados nas categorias de peso normal e de excesso de peso, indica diferença significativa nas proporções entre homens e mulheres ($\chi^2_{(1)} = 9,07$; $p = 0,002$).

A frequência de obesos entre os homens é de 10,6% e entre as mulheres é de 10,1%. A comparação entre homens e mulheres, quando classificados em obesos ($\text{IMC} \geq 30$) e não obesos ($\text{IMC} < 30$), mostra que não existe diferença significativa entre os sexos ($\chi^2_{(1)} = 0,09$; $p = 0,74$).

As frequências de obesos e não obesos nos Afro-brasileiros e Euro-brasileiros componentes da amostra total de doadores de sangue não apresentam diferença significativa (tabela 5.1).

Tabela 5.1. Frequência percentual de obesos e não obesos nos Afro-brasileiros e euro-brasileiros e na amostra total de doadores de sangue e valor de χ^2 e p para a comparação entre os grupos étnicos*.

Grupo étnico	% \pm EP		$\chi^2_{(1)}$; p
	Obesos	Não obesos	
Euro-brasileiros (N = 2852)	10,4 \pm 5,7%	89,6 \pm 5,7%	0,11; 0,74
Afro-brasileiros (N = 82)	12,2 \pm 3,6%	87,8 \pm 3,6%	
Amostra total (N= 2953)	10,5 \pm 0,6%	89,5 \pm 0,6%	

* O grupo de asiáticos não foi incluído devido ao pequeno número de indivíduos (N = 06). Na amostra total de 2953 doadores de sangue constam 13 indivíduos sem indicação de grupo étnico.

A distribuição das categorias de IMC por faixa etária é mostrada na figura 5.2. A tabela 5.2 mostra as comparações (χ^2 e p) das distribuições das categorias de peso normal, excesso de peso e obesidade entre as faixas etárias.

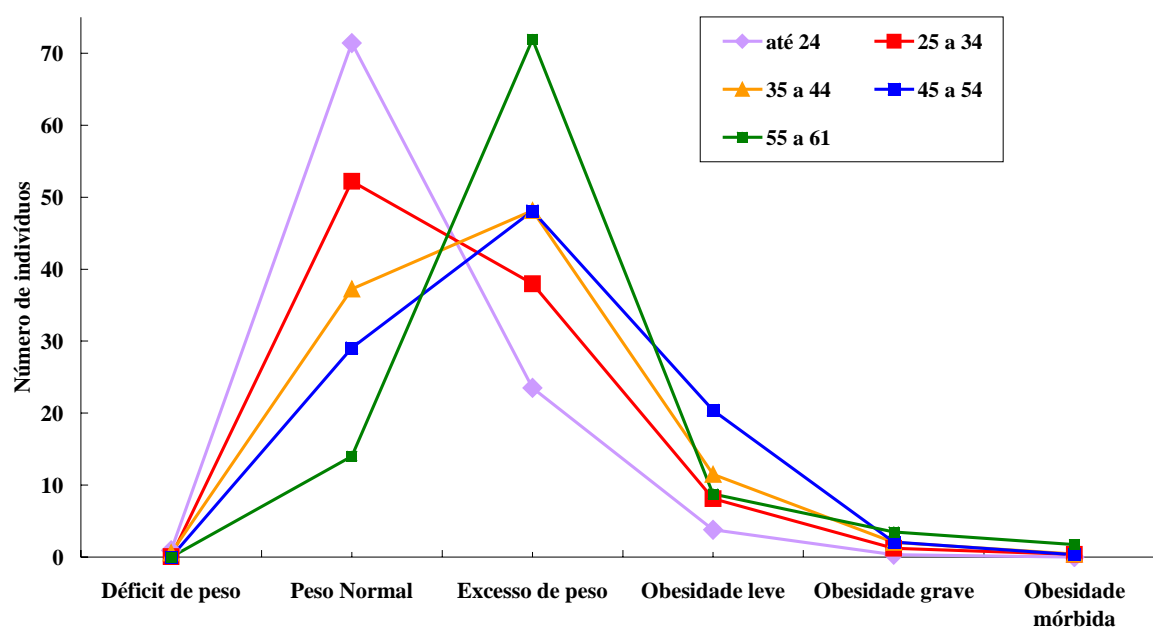


Figura 5.2. Distribuição de indivíduos por categorias de IMC por faixa etária na amostra total de doadores de sangue de Curitiba.

Tabela 5.2. Valores de χ^2 (p) para as comparações das proporções das categorias de peso normal, excesso de peso e obesidade entre as faixas etárias.

Peso normal				
Faixas etárias (N)	55-61 (08)	45-54 (84)	35-44 (252)	25-34 (554)
até 24 (619)	$\chi^2_{(1)} = 21,4$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 45,6$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 52,1$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 18,4$ (p < 0,0001)*
25-34 (554)	$\chi^2_{(1)} = 12,6$ (p = 0,0004)*	$\chi^2_{(1)} = 18,8$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 13,3$ (p = 0,0003)*	—
35-44 (252)	$\chi^2_{(1)} = 6,25$ (p = 0,0125)*	$\chi^2_{(1)} = 2,85$ (p = 0,0914)	—	—
45-54 (84)	$\chi^2_{(1)} = 2,89$ (p = 0,0891)	—	—	—
Excesso de peso				
	55-61 (41)	45-54 (139)	35-44 (326)	25-34 (403)
até 24 (204)	$\chi^2_{(1)} = 26,3$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 29,7$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 48,0$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 23,1$ (p < 0,0001)*
25-34 (403)	$\chi^2_{(1)} = 8,53$ (p = 0,0035)*	$\chi^2_{(1)} = 3,9$ (p = 0,0469)*	$\chi^2_{(1)} = 7,4$ (p = 0,0067)*	—
35-44 (326)	$\chi^2_{(1)} = 3,0$ (p = 0,0835)	$\chi^2_{(1)} = 0,0007$ (p = 0,9968)	—	—
45-54 (139)	$\chi^2_{(1)} = 2,70$ (p = 0,1002)	—	—	—
Obesidade¹				
	55-61 (08)	45-54 (66)	35-44 (95)	25-34 (103)
até 24 (36)	$\chi^2_{(1)} = 7,7$ (p = 0,0055)*	$\chi^2_{(1)} = 70,1$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 38,6$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 18,01$ (p < 0,0001)*
25-34 (103)	$\chi^2_{(1)} = 0,52$ (p = 0,4702)	$\chi^2_{(1)} = 25,08$ (p < 0,0001)*	$\chi^2_{(1)} = 5,83$ (p = 0,0158)*	—
35-44 (95)	$\chi^2_{(1)} = 0,03$ (p = 0,8559)	$\chi^2_{(1)} = 7,15$ (p = 0,0075)*	—	—
45-54 (66)	$\chi^2_{(1)} = 1,1$ (p = 0,2958)	—	—	—

¹ Obesos leves, graves e mórbidos.* Diferença significativa.

As médias de idade nos indivíduos com déficit de peso, peso normal, excesso de peso, obesidade leve, grave e mórbida são: $26,8 \pm 2,5$ anos; $28,5 \pm 0,2$ anos; $34,2 \pm 0,3$ anos; $36,2 \pm 0,6$ anos; $37,3 \pm 1,5$ anos e $39,1 \pm 3,1$ anos, respectivamente (figura 5.3).

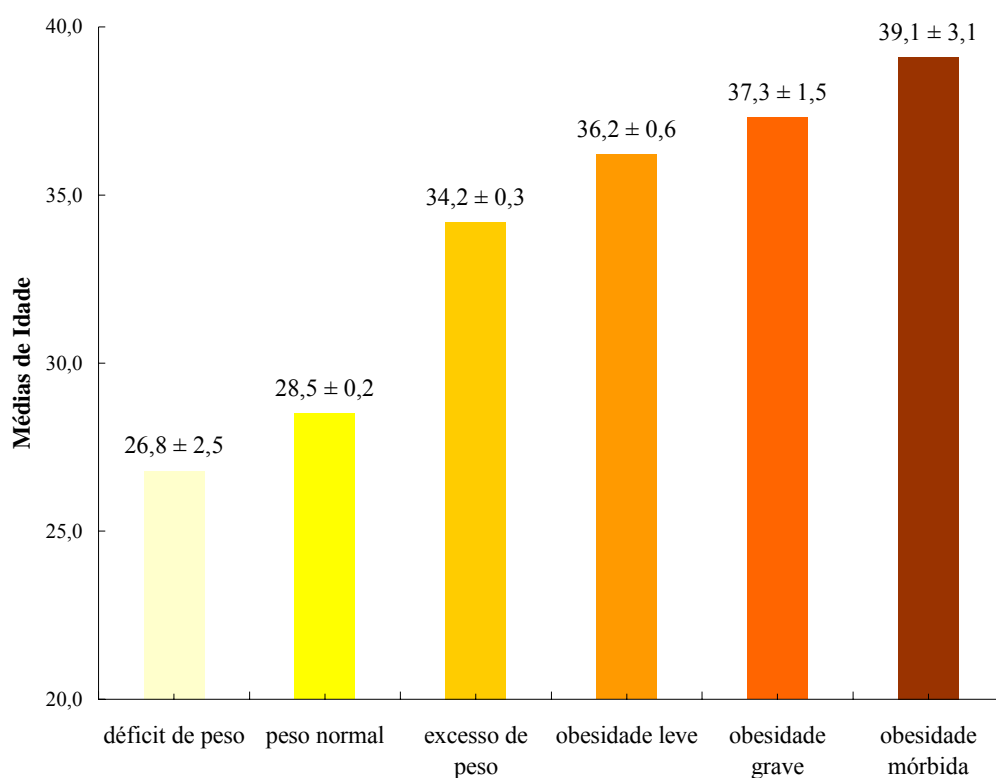


Figura 5.3. Médias de idade, em anos, dos indivíduos da amostra total de doadores de sangue que apresentam déficit de peso, peso normal, excesso de peso, obesidade leve, grave e mórbida.

A tabela 5.3 mostra as comparações entre as médias de idade e as variâncias dos indivíduos pertencentes às diferentes categorias de IMC. As categorias de déficit de peso e obesidade mórbida não são incluídas na análise devido ao número reduzido de indivíduos doadores de sangue que pertencem a essas categorias ($N = 13$ e $N = 09$, respectivamente).

Tabela 5.3. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias de idade dos indivíduos pertencentes às categorias IMC de peso normal, obesidade leve e grave.

Categorias de IMC (N)	Obesidade grave (38)	Obesidade leve	Excesso de peso
Peso normal (1517)	$t = 6,38 (2,4 \times 10^{-10})^*$	$t = 13,43 (3 \times 10^{-39})^*$	$t = 15,88 (10^{-9})^*$
	$F = 1,15 (0,50)$	$F = 1,28 (0,0063)^*$	$F = 1,35 (< 10^{-5})^*$
Excesso de peso (1113)	$t = 1,97 (0,048)^*$	$t = 3,11 (0,019)^*$	—
	$F = 1,17 (0,56)$	$F = 1,05 (0,64)$	—
Obesidade leve (261)	$t = 0,67 (0,50)$	—	—
	$F = 1,12 (0,70)$	—	—

* Diferença significativa.

Existe diferença significativa nas médias de idade de obesos e não obesos, tanto na amostra total de doadores de sangue, como para os homens e para as mulheres, analisados separadamente (tabela 5.4). A tabela 5.5 mostra as médias de idade (\pm EP) e as comparações entre obesos ($\text{IMC} \geq 30$) e indivíduos com peso normal ($18,5 < \text{IMC} < 25$) para homens, mulheres e para o total. A figura 5.4 mostra a distribuição da idade para obesos e indivíduos com peso normal.

Nos 241 homens Euro-brasileiros obesos da amostra total, as médias de idade são: 35,9 anos \pm 0,6 anos para obesos leves; 38,0 anos \pm 1,8 anos para obesos graves e 35,9 anos \pm 2,6 anos para obesos mórbidos, não havendo diferença significativa entre os grupos de obesos (tabela 5.6). A comparação das médias e variâncias de idade entre as categorias de obesidade leve e obesidade grave e mórbida reunidas não mostraram diferenças significativas ($t = 0,92$; $p = 0,36$ e $F = 1,28$; $p = 0,42$).

Tabela 5.4. Médias e variâncias de idade (\pm EP) e comparações (t; p e F; p) entre obesos e não obesos nos homens, nas mulheres e na amostra total.

Sexo	Obesos		Não obesos		t (p)	F (p)
	Média \pm EP	s ²	Média \pm EP	s ²		
Masculino	36,03 \pm 0,59	86,03	30,75 \pm 0,20	88,60	8,4 (9,2x10 ⁻¹⁷)*	1,03 (0,78)
Feminino	38,23 \pm 1,32	104,25	31,32 \pm 0,42	93,74	5,3 (2,5x10 ⁻²)*	1,11 (0,54)
Total	36,46 \pm 0,54	90,04	30,86 \pm 0,18	89,65	9,8 (2,4x10 ⁻²²)*	1,00 (0,94)

*Diferença significativa.

Tabela 5.5. Médias e variâncias de idade (\pm EP) e comparações (t; p e F; p) entre obesos e indivíduos de peso normal nos homens, nas mulheres e na amostra total.

Sexo	Obesos		Peso normal		t (p)	F (p)
	Média \pm EP	s ²	Média \pm EP	s ²		
Masculino	36,03 \pm 0,59	86,03	28,25 \pm 0,24	69,45	13,1 (1,3x10 ⁻²⁸)*	1,24 (0,025)*
Feminino	38,23 \pm 1,32	104,25	29,28 \pm 0,48	77,28	7,1 (6,5x 10 ⁻¹²)*	1,34 (0,11)
Total	36,46 \pm 0,54	90,04	28,48 \pm 0,22	71,32	14,8 (1,9x10 ⁻³⁵)*	1,26 (0,006)*

*Diferença significativa.

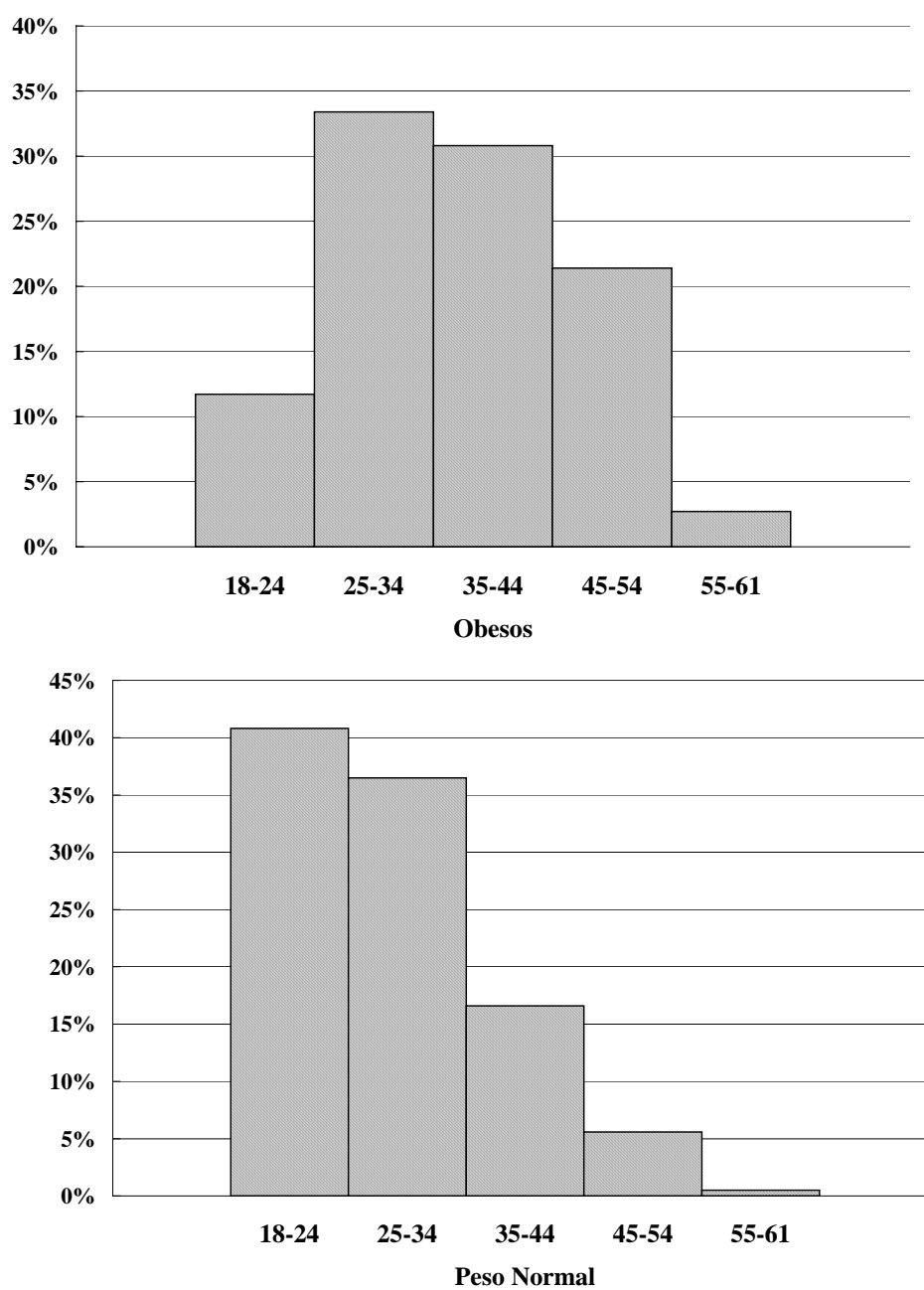


Figura 5.4. Distribuição de idade para 308 obesos e 1517 indivíduos com peso normal.

Tabela 5.6. Resultados das comparações entre as médias e variâncias de idade dos três tipos de obesos nos 241 homens Euro-brasileiros obesos da amostra total de doadores de sangue.

Categorias de IMC (N)	Obesidade mórbida (07)	Obesidade grave (23)
Obesidade leve (211)	t = 0,001 (0,99)	t = 1,05 (0,29)
	F = 1,92 (0,42)	F = 1,15 (0,72)
Obesidade grave (23)	t = 0,60 (0,55)	—
	F = 1,66 (0,55)	

5.1.2. Amostra de obesos utilizada nesse estudo

Na amostra, de 153 homens Euro-brasileiros obesos, utilizada nesse estudo, as médias de idade dos indivíduos obesos leves, graves e mórbidos são: $36,2 \pm 0,9$ anos; $38,0 \text{ anos} \pm 1,8$ e $35,9 \text{ anos} \pm 2,6$, respectivamente (figura 5.5), não havendo diferença significativa entre os grupos de obesos. A tabela 5.7 mostra os resultados das comparações das médias de idade para os três tipos de obesos incluídos nesse estudo. A figura 5.6 mostra a distribuição da idade nos obesos leves e nos obesos graves e mórbidos reunidos.

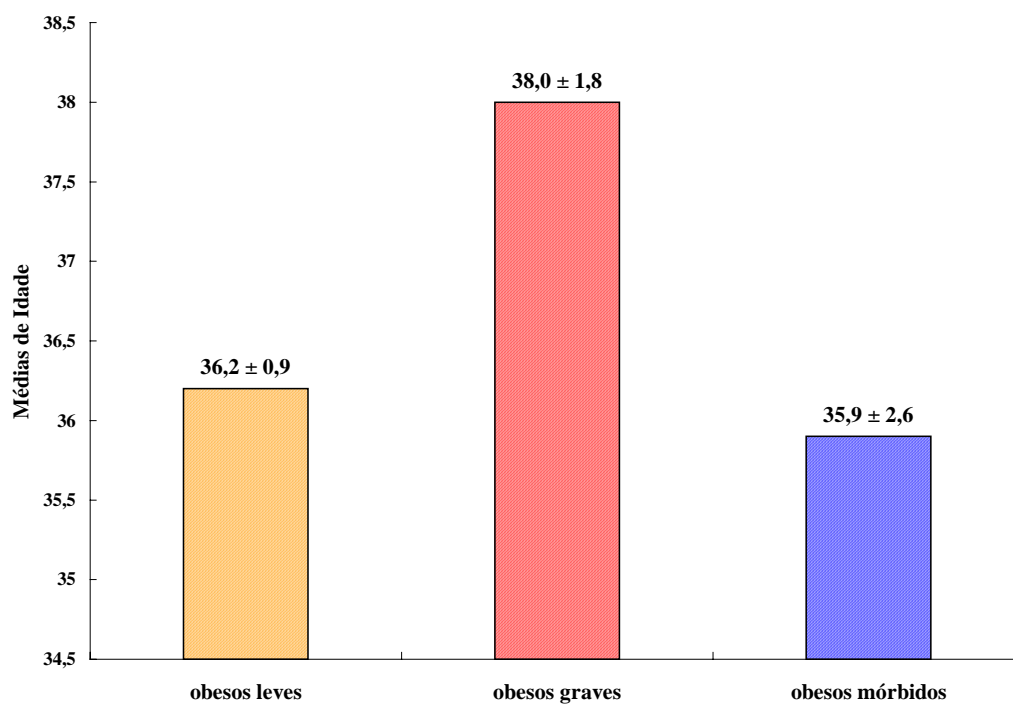


Figura 5.5. Médias de idade (\pm EP) dos indivíduos obesos leves, graves e mórbidos componentes da amostra desse estudo.

Tabela 5.7. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e variâncias de idade dos três tipos de obesos da amostra desse estudo.

Categorias de IMC (N)	Obesidade Leve (123)	Obesidade Grave (23)
Obesidade grave (23)	t = 0,85 (0,40)	—
	F = 1,24 (0,57)	
Obesidade Mórbida (07)	t = 0,08 (0,93)	t = 0,60 (0,55)
	F = 2,07 (0,36)	F = 1,66 (0,55)
Obesidade Grave + Mórbida (30)	t = 0,70 (0,49)	—
	F = 1,39 (0,31)	

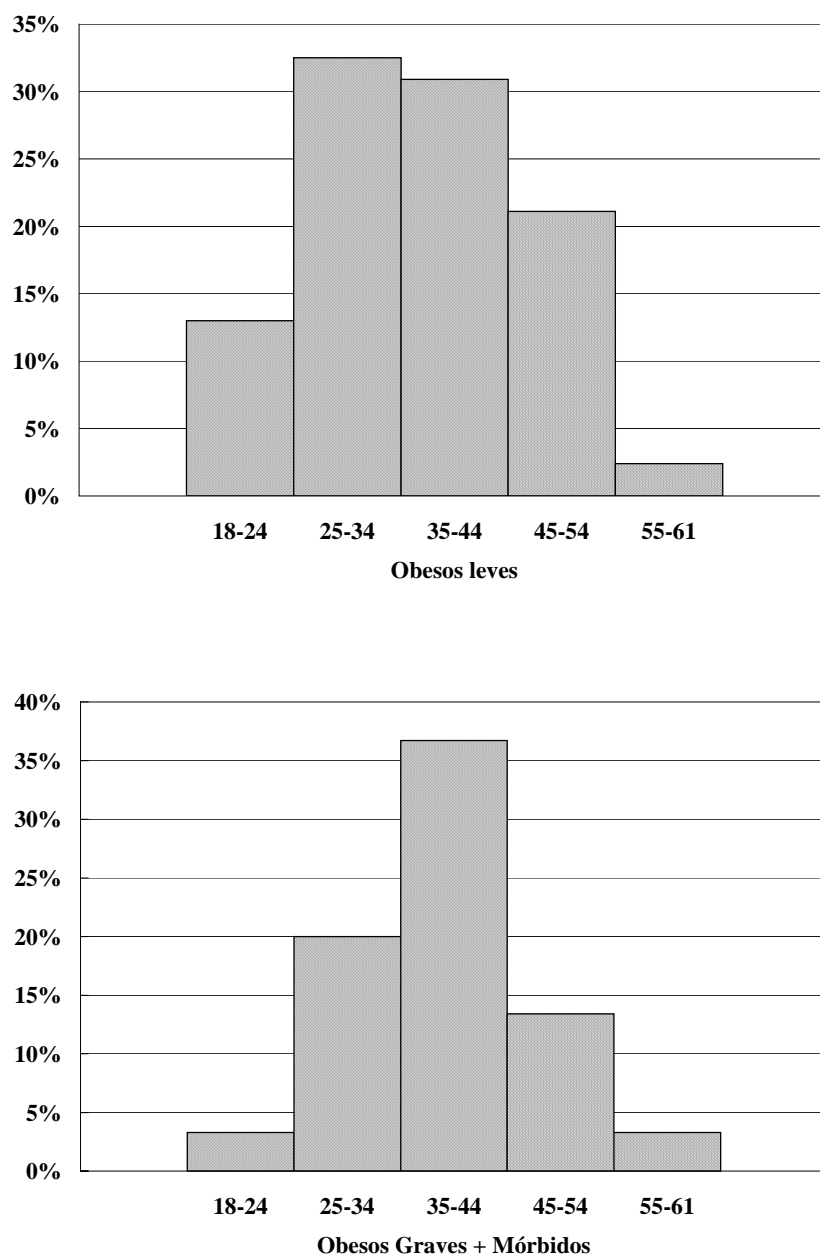


Figura 5.6. Distribuição da idade em 123 obesos leves e 30 obesos graves e mórvidos reunidos.

5.2 FENOTIPAGEM DO LOCO *CHE2* E ATIVIDADE DA BChE

As médias (\pm EP), variâncias e amplitudes de variação da atividade enzimática (KU/L) nos obesos e nos controles, bem como os valores de t (p) e F (p) para a comparação entre as médias e variâncias são mostrados na tabela 5.8. A figura 5.7 mostra a distribuição da atividade da BChE em obesos e controles.

Foram fenotipados para o loco *CHE2* 153 indivíduos de peso normal e 153 indivíduos obesos. A figura 5.8 mostra a reprodução de uma placa de gel de ágar submetida à eletroforese permitindo a identificação dos fenótipos *CHE2* C5+ e *CHE2* C5-. A tabela 5.9 mostra as frequências dos fenótipos *CHE2* C5+ e *CHE2* C5- em obesos e controles, bem como o resultado da comparação dessas frequências entre os dois grupos. A tabela 5.10 mostra as médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação da atividade da BChE e valores de t (p) e F (p) para as comparações das médias e variâncias entre indivíduos *CHE2* C5+ e *CHE2* C5- dentro do grupo de obesos e controles. A tabela 5.11 mostra as comparações entre obesos e controles, classificados em *CHE2* C5+ e *CHE2* C5-. A tabela 5.12 mostra as médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação do IMC e valores de t (p) e F (p) para as comparações das médias e variâncias entre obesos *CHE2* C5+ e *CHE2* C5-. A figura 5.9 mostra a distribuição da atividade da BChE em obesos classificados como *CHE2* C5+ e *CHE2* C5- e a figura 5.10 mostra a distribuição da atividade da BChE em controles classificados como *CHE2* C5+ e *CHE2* C5-. A distribuição do IMC em obesos classificados como *CHE2* C5+ e *CHE2* C5- é mostrada na figura 5.11.

Tabela 5.8. Médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação (AV) da atividade enzimática (KU/L) nos obesos e nos controles e valores de t (p) e F (p) para a comparação entre as médias e variâncias.

Grupos	Média \pm EP	s ²	AV	t (p)	F (p)
Obesos	6,55 \pm 0,23	8,21	1,69 – 18,24	6,69 (1,56 x 10 ⁻¹⁰)*	3,11 (9,9 x 10 ⁻¹²)*
Controles	4,77 \pm 0,13	2,64	2,08 – 14,01		

* Diferença significativa.

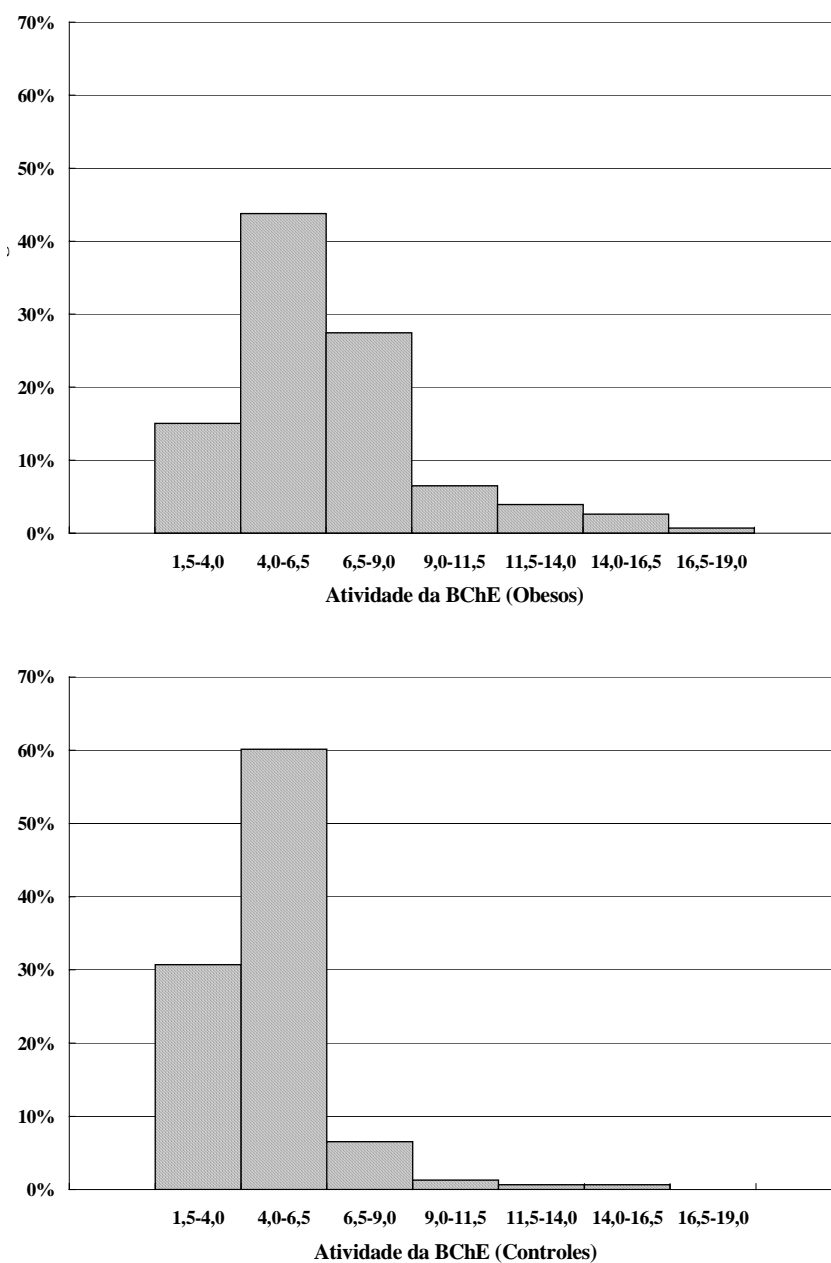


Figura 5.7. Distribuição da atividade da BChE (KU/L) em 153 obesos e 153 controles.

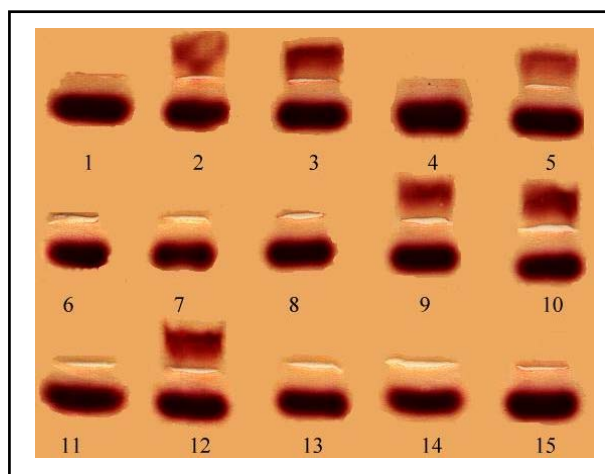


Figura 5.8. Reprodução de uma placa de gel de ágar 1,4%, pH 6,38, submetida à eletroforese, permitindo a identificação dos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-. As amostras 2, 3, 5, 9, 10 e 12 têm fenótipo CHE2 C5+ e as demais amostras têm fenótipo CHE2 C5-.

Tabela 5.9. Frequências e números absolutos de indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- nos grupos de obesos e controles. Valor de χ^2 (p) para a comparação das frequências fenotípicas entre obesos e controles.

Fenótipos	Obesos		Controles		$\chi^2_{(1)} (p)$
	N	% \pm EP	N	% \pm EP	
CHE2 C5+	8	5,23% \pm 1,80%	16	10,46% \pm 2,47%	2,89 (0,08)
CHE2 C5-	145	94,77% \pm 1,80%	137	89,54% \pm 2,47%	

Tabela 5.10. Médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação da atividade da BChE em obesos e controles, classificados como CHE2 C5+ e CHE2 C5– e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e as variâncias dentro do grupo de obesos e de controles.

	N	Média \pm EP	s ²	AV		
Fenótipos	Obesos				t (p)	F (p)
CHE2 C5+	8	9,17 \pm 0,90	6,51	6,13 – 13,76	2,71 (0,007)*	1,22 (0,85)
CHE2 C5–	145	6,40 \pm 0,23	7,95	1,69 – 18,24		
	Controles					
CHE2 C5+	16	6,04 \pm 0,48	3,62	3,88 – 9,94	3,43 (0,0008)*	1,54 (0,19)
CHE2 C5–	137	4,62 \pm 0,13	2,34	2,08 – 14,01		

* Diferença significativa.

Tabela 5.11. Valores de t (p) e F (p) para as comparações da atividade da BChE entre obesos e controles classificados como CHE2 C5+ e CHE2 C5–.

	CHE2 C5+				CHE2 C5–			
	Média ± EP	s ²	t (p)	F (p)	Média ± EP	s ²	t (p)	F (p)
Obesos	9,17 ± 0,90	6,51	3,38 (0,02)*	1,80 (0,32)	6,40 ± 0,23	7,95	6,56 (< 10 ⁻⁴)*	3,40 (< 10 ⁻⁴)*
Controles	6,04 ± 0,48	3,62			4,62 ± 0,13	2,34		

* Diferença significativa.

Tabela 5.12. Médias (\pm EP), variâncias, amplitudes de variação do IMC em obesos classificados como CHE2 C5+ e CHE2 C5– e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e as variâncias.

Fenótipos	N	Média \pm EP	s^2	AV	t (p)	F (p)
CHE2 C5+	8	35,01 \pm 1,84	26,97	30,49 – 45,68	1,88 (0,06)	2,94 (0,01)*
CHE2 C5–	145	32,86 \pm 0,25	9,16	30,04 – 47,12		

* Diferença significativa.

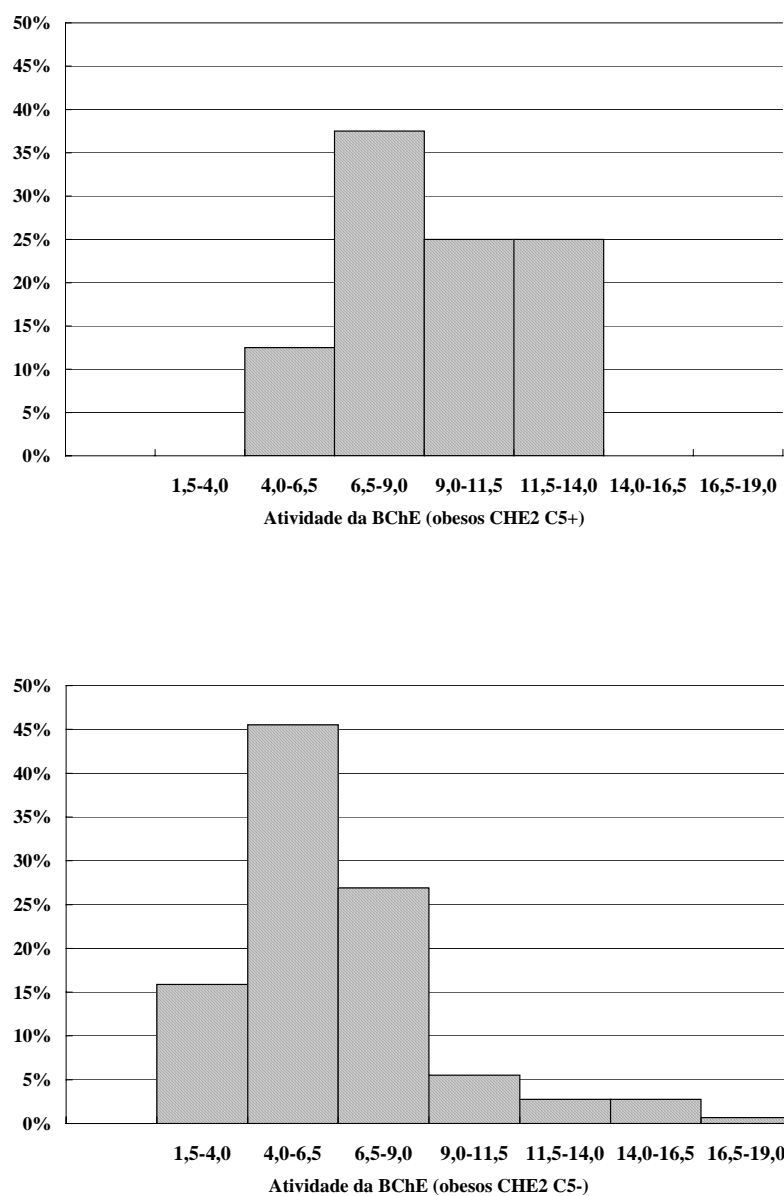


Figura 5.9. Distribuição da atividade da BChE (KU/L) em oito obesos CHE2 C5+ e 145 obesos CHE2 C5-.

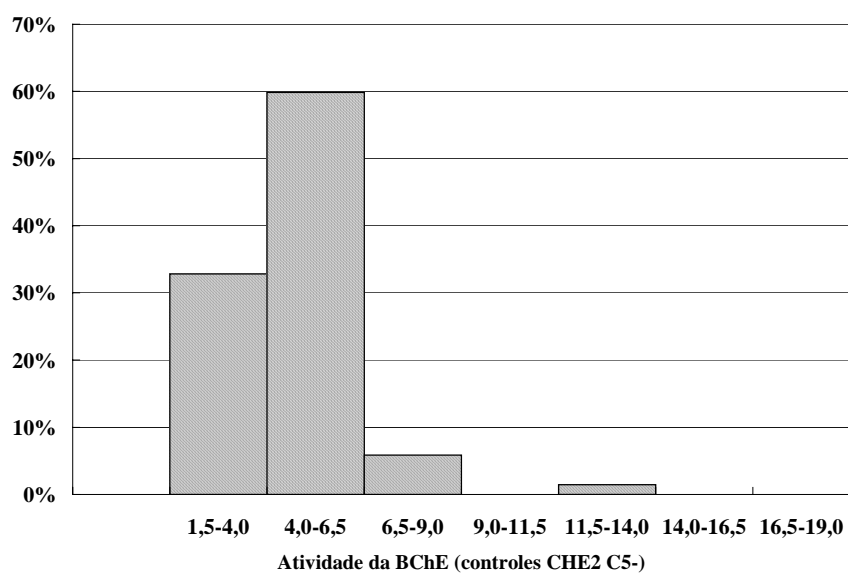
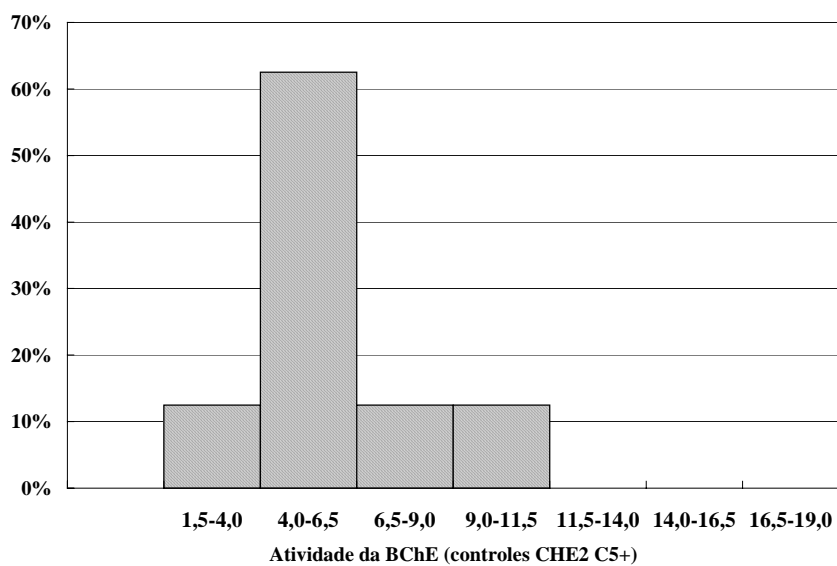


Figura 5.10. Distribuição da atividade da BChE (KU/L) em 16 controles CHE2 C5+ e 137 CHE2 C5-.

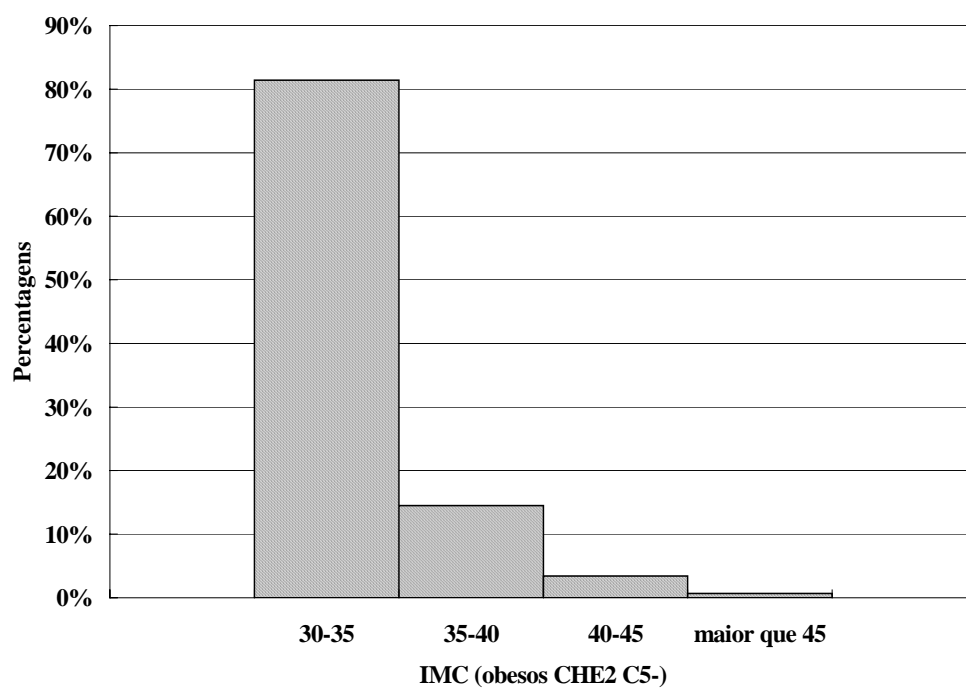
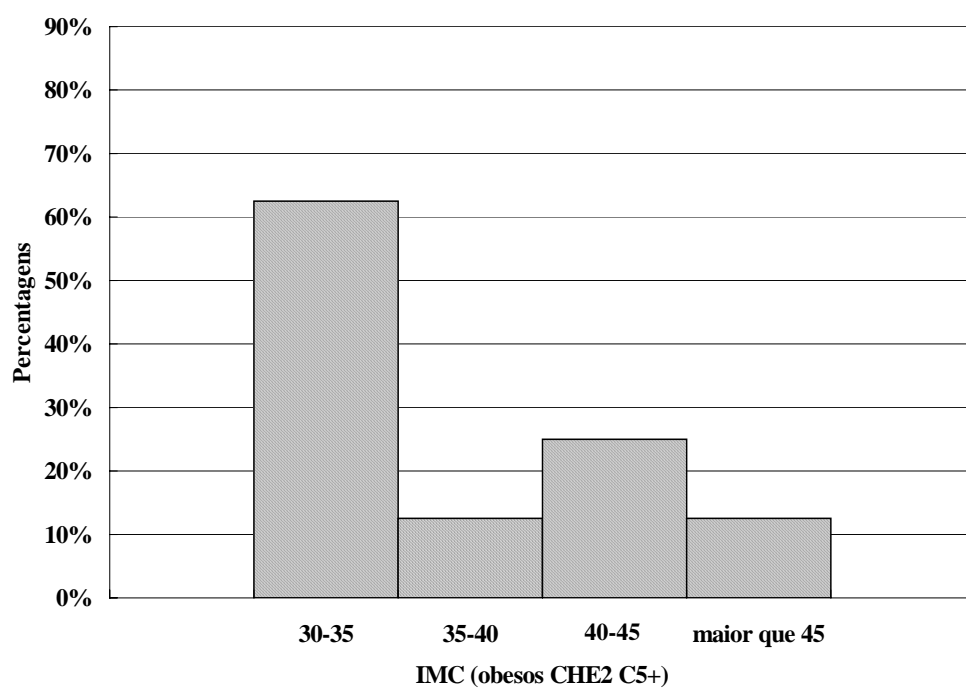


Figura 5.11. Distribuição do IMC em oito obesos CHE2 C5+ e 145 CHE2 C5-.

5.3 GENOTIPAGEM DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE *BCHE*

A genotipagem da região regulatória a montante do gene *BCHE*, através de PCR e eletroforese SSCA, não permitiu a identificação de variabilidade em nenhum dos três fragmentos analisados (RR1, RR2 e RR3). Foram realizadas duas metodologias diferentes de eletroforese para a análise de cada fragmento (ver tabela 4.2). A tabela 5.13 mostra o número de indivíduos analisados através de cada tipo de eletroforese para cada um dos três fragmentos da região regulatória do gene *BCHE*. As figuras 5.12, 5.13 e 5.14 são reproduções de placas de gel de poliacrilamida, submetidas à eletroforese, para os fragmentos RR1; RR2 e RR3, respectivamente.

Tabela 5.13. Número de obesos e controles analisados, através de duas diferentes condições de eletroforese SSCA, para os três fragmentos analisados da região regulatória a montante do gene *BCHE*.

Eletroforese ¹	Obesos (N)			Controles (N)		
	RR1	RR2	RR3	RR1	RR2	RR3
Condição 1	140	144	152	142	142	146
Condição 2	88	70	93	85	68	94

¹ Ver tabela 4.2.

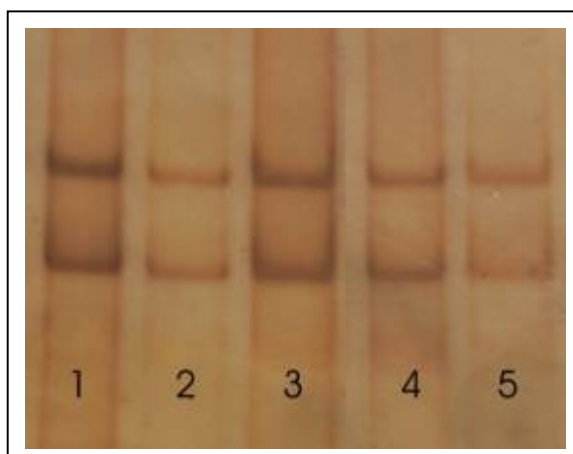


Figura 5.12. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, contendo os fragmentos de 151 pb (RR1) da região regulatória a montante, amplificados pelos iniciadores PROF1 e PROR1. As amostras 1, 2, 3, 4 e 5 permitem a visualização da homogeneidade dos fragmentos amplificados em cinco indivíduos diferentes.

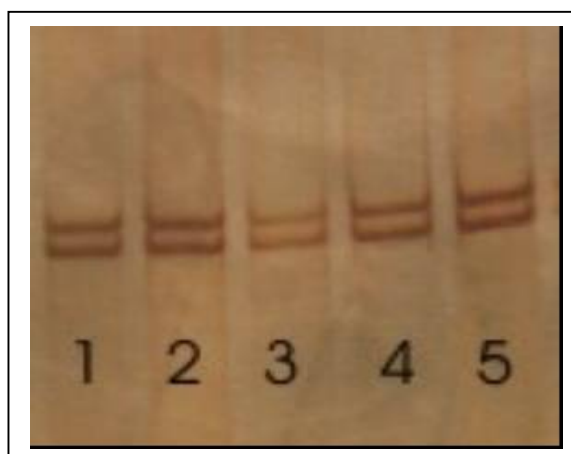


Figura 5.13. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos de 187 pb (RR2) da região regulatória a montante, amplificados pelos iniciadores PROF2 e PROR2. As amostras 1, 2, 3, 4 e 5 permitem a visualização da homogeneidade dos fragmentos amplificados em cinco indivíduos diferentes.

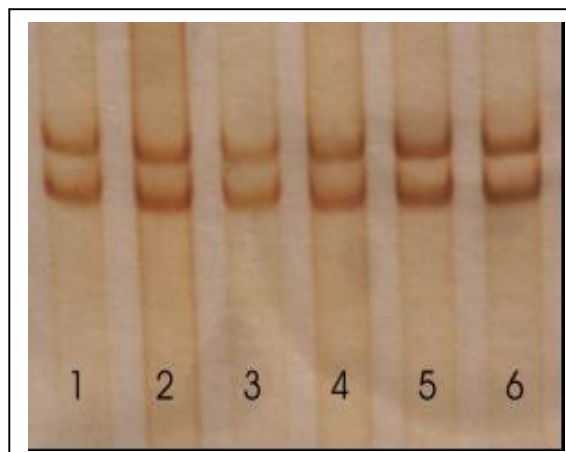


Figura 5.14. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos de 176 pb (RR3) da região regulatória a montante, amplificados pelos iniciadores PROF3 e PROR3. As amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 permitem a visualização da homogeneidade dos fragmentos amplificados em cinco indivíduos diferentes.

5.4 GENOTIPAGEM DOS EXONS DO LOCO *BCHE*

Foram analisados, por PCR-SSCA, 5 fragmentos de exons do gene *BCHE*, um referente ao exon 1, três ao exon 2 e um ao exon 4 (ver item 4.2.5). As figuras 5.15, 5.16, 5.17, 5.18 e 5.19 mostram reproduções de placas de gel de poliacrilamida, submetidas à eletroforese, permitindo a identificação dos genótipos para cada fragmento amplificado do loco *BCHE*.

O seqüenciamento dos fragmentos do gene *BCHE*, amplificados pelo par de iniciadores PROF3 e E1R e pelo par E1F e E1R, permitiu a identificação de uma substituição de nucleotídeo (G→A) na posição nt-116. Para confirmação do seqüenciamento, cada amostra foi seqüenciada quatro vezes, tendo sido obtidos os mesmos resultados nos quatro seqüenciamentos. A tabela 5.14 mostra os resultados para os 12 indivíduos seqüenciados, através dos dois pares de iniciadores. As figuras 5.20 e 5.21 mostram, respectivamente, os eletroferogramas de um indivíduo homozigoto G/G na posição nt-116 e de um heterozigoto G/A.

Os mesmos 12 indivíduos, quando seqüenciados com o par de iniciadores PROF3 e E1R, foram analisados para o fragmento RR3 da região regulatória a montante do gene *BCHE*, não tendo sido encontrada nenhuma variação em relação à seqüência usual.

As freqüências dos alelos identificados, bem como as comparações dessas freqüências entre obesos e controles são mostradas na tabela 5.15. As freqüências genotípicas e os valores de χ^2 (p) para as comparações entre obesos e controles são mostrados na tabela 5.16. Para todos esses fragmentos do gene *BCHE*, as amostras de obesos e controles estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 5.17). A tabela 5.18 mostra os genótipos, referentes ao exon 4 do gene *BCHE* (A539T) e de parte do exon 2 (heterozigotos para a mutação D70G) em obesos, controles e para obesos e controles reunidos. A proporção de indivíduos heterozigotos A/G na posição nt -116, classificados de acordo com o genótipo para a variante A539T do exon 4 é mostrada na tabela 5.19. A tabela 5.20 mostra as freqüências dos haplótipos referentes à posição -116 do exon 1 e à mutação A539T do exon 4 e os valores de χ^2 (p), D e D' para o desequilíbrio de ligação entre os dois sítios.



Figura 5.15. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 1 amplificados pelos iniciadores E1F e E1R. As amostras 1, 2, 3 e 4 são *-116 G/-116 A*. As amostras 5, 6 e 7 são homozigotas *-116 G/-116 G*.

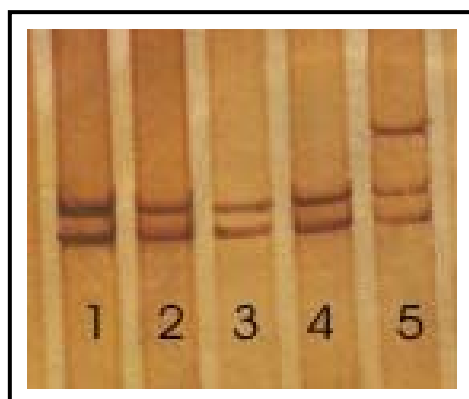


Figura 5.16. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 2 amplificados pelos iniciadores N25 e N23. As amostras 1, 2, 3 e 4 são homozigotas para o alelo usual e a amostra 5 é heterozigota para a mutação *D70G (A)*.

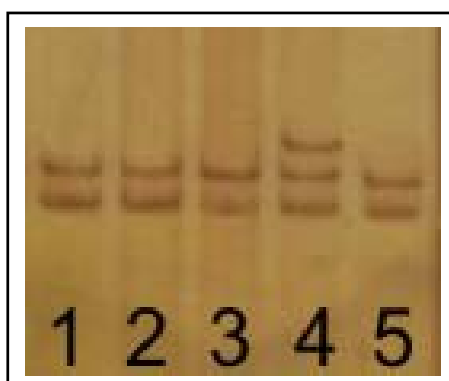


Figura 5.17. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 2 amplificados pelos iniciadores P25 e N53. As amostras 1, 2, 3 e 5 são homozigotas para o alelo usual e a amostra 4 é heterozigota para a mutação *T243M* (*F-1*).

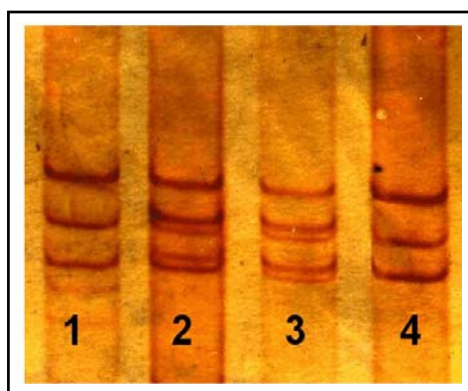


Figura 5.18. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 2 amplificados pelos iniciadores N75 e N73. As amostras 1 e 4 são homozigotas para o alelo usual e as amostras 2 e 3 são heterozigotas para a mutação *G390V* (*F-2*).

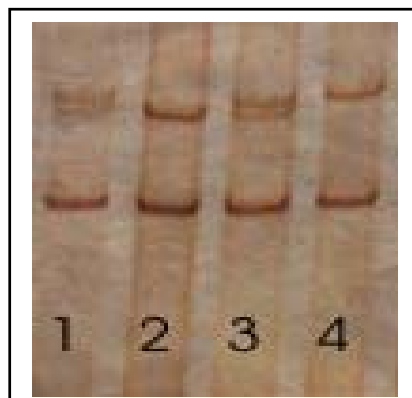


Figura 5.19. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, contendo os fragmentos amplificados do exon 4 pelos iniciadores P43 e P45. A amostra 2 é homozigota para o alelo usual, as amostras 1 e 3 são heterozigotas para a mutação *A539T* (*K*) e a amostra 4 é homozigota para o alelo *A539T*.

Tabela 5.14. Resultado do seqüenciamento de 12 indivíduos referente à região nt-116, através dos pares de iniciadores PRO3F e E1R e E1F e E1R.

Número de indivíduos	Genótipo (nt-116)	
	PRO3F e E1R	E1F e E1R
Obesos		
05	G/G	G/G
02	G/A	G/A
Controles		
02	G/G	G/G
03	G/A	G/A

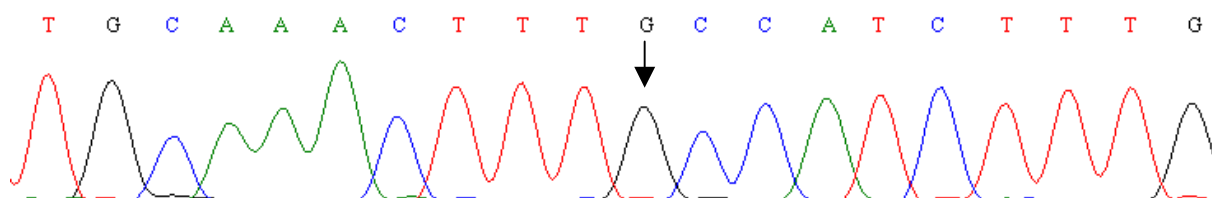


Figura 5.20. Eletroferograma da região do nt -116 do gene *BCHE*, permitindo a identificação de homozigose (G/G) na posição nt-116. A seta indica a posição nt-116.

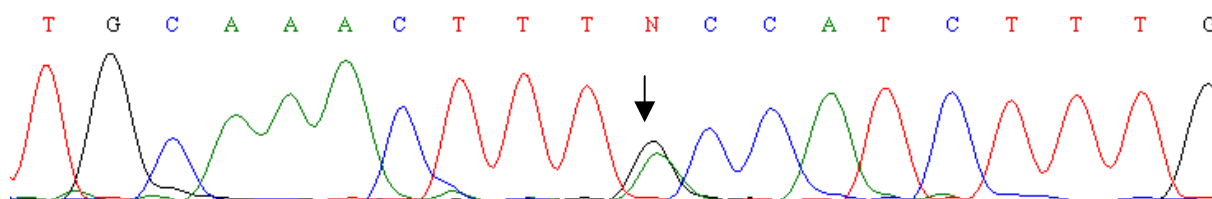


Figura 5.21. Eletroferograma da região do nt -116 do gene *BCHE*, permitindo a identificação de heterozigose (G/A) na posição nt-116. A seta indica a posição nt-116.

Tabela 5.15. Frequências dos alelos identificados, por PCR-SSCA, nos cinco fragmentos analisados do loco *BCHE* para obesos e controles e comparação das frequências alélicas entre obesos e controles ($\chi_{(1)}^2$; p).

Alelos	Obesos		Controles		$\chi_{(1)}^2$ (p)	Obesos + Controles	
	N ¹	% \pm EP	N ¹	% \pm EP		N ¹	% \pm EP
<i>Exon 1</i>							
-116 A ²	172	8,72 \pm 2,15%	156	8,33 \pm 2,21%	0,02 (> 0,99)	328	8,54 \pm 1,54%
<i>Exon 2</i>							
D70G (A) ³	282	1,42 \pm 0, 70%	286	0,71 \pm 0,50%	0,70 (= 0,87)	568	1,06 \pm 0,43%
T243M (F-1) ⁴	284	0,35 \pm 0,35%;	280	0,36 \pm 0,36%	0,001 (> 0,99)	564	0,35 \pm 0,25%
G390V (F-2) ⁵	282	1,42 \pm 0,70%	286	1,05 \pm 0,60%	0,16 (> 0,98)	568	1,23 \pm 0,43%
<i>Exon 4</i>							
A539T (K)	284	19,37 \pm 2,34%	290	19,31 \pm 2,32%	0,0003 (> 0,99)	574	19,34 \pm 1,35%

¹ Número total de cromossomos analisados para o fragmento em questão. ² Resultados de PCR-SSCA, incluindo os 12 indivíduos confirmados por seqüenciamento. ³ Fragmento amplificado através do par de iniciadores N25 e N23. ⁴ Fragmento amplificado através do par de iniciadores P25 e N53. ⁵ Fragmento amplificado através do par de iniciadores N75 e N73.

Tabela 5.16. Frequências dos genótipos identificados nos cinco fragmentos analisados do gene *BCHE* e valores de χ^2 (p) para comparações entre obesos e controles.

Genótipos	Obesos		Controles		$\chi_{(1)}^2$ (p) ²
	N ¹	% \pm EP	N ¹	% \pm EP	
Exon 1					
-116 G/-116 G	71	82,56 \pm 4,09%	65	83,33 \pm 4,22%	0,01 (0,94)
-116 G/ -116 A	15	17,44 \pm 4,09%	13	16,67 \pm 4,22%	
Exon 2					
U/U	137	97,16 \pm 1,40%	141	98,60 \pm 0,98%	0,18 (0,67)
U/D70G	04	2,84 \pm 1,40%	2	1,40 \pm 0,98%	
U/U	141	99,30 \pm 0,70%	139	99,29 \pm 0,70%	0,49 (0,48)
U/T243M	01	0,70 \pm 0,70%	01	0,71 \pm 0,70%	
U/U	137	97,16 \pm 1,40%	140	97,90 \pm 1,20%	0,002 (0,98)
U/G390V	04	2,84 \pm 1,40%	03	2,10 \pm 1,20%	
Exon 4					
U/U	93	65,49 \pm 3,99%	96	66,21 \pm 3,93%	0,003 (0,99)
U/A539T	43	30,28 \pm 3,86%	42	28,96 \pm 3,77%	
A539T / A539T	06	4,23 \pm 1,68%	07	4,83 \pm 1,78%	

¹ Número de indivíduos identificados para cada fragmento do gene *BCHE* analisado. ² Para o exon 4, χ^2 com dois graus de liberdade.

Tabela 5.17. Valores de χ^2 (p) para teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg dos genótipos relativos às mutações identificadas nos fragmentos do gene *BCHE* em obesos, controles e no total.

	Obesos	Controles	Obesos + Controles
Genótipos (N) ¹	$\chi_{(2)}^2$ (p)	$\chi_{(2)}^2$ (p)	$\chi_{(2)}^2$ (p)
Exon 1(nt-116)			
G/A (13; 15)	0,10 (p> 0,74)	0,13 (p> 0,72)	1,43 (p> 0,49)
G/G (65; 71)			
Exon 2			
Iniciadores N25 e N23			
U/D70G (04; 02)	0,029 (p> 0,98)	0,007 (p> 0,99)	0,032 (p> 0,98)
U/U (137; 141)			
Iniciadores P25 e N53			
U/T243M (01; 01)	0,002 (p > 0,99)	0,002 (p > 0,99)	0,0001 (p > 0,998)
U/U (141; 139)			
Iniciadores N75 e N73			
U/G390V (04; 03)	0,029 (p > 0,98)	0,016 (p > 0,99)	0,007 (p > 0,99)
U/U (137; 140)			
Exon 4			
U/A539T (43; 42)			
A539T/A539T (06; 07)	0,13 (p > 0,93)	0,72 (p > 0,69)	0,74 (p > 0,69)
U/U (93; 96)			

¹ Valores de N (obesos; controles).

Tabela 5.18. Número de indivíduos homozigotos *U/U* e heterozigotos para a mutação *D70G* (A) do exon 1 e seus genótipos quanto ao exon 4 do gene *BCHE* (*A539T*) em obesos, controles e na amostra total .

Exon 4	Obesos		Controles		Obesos + Controles	
	<i>U/D70G</i>	<i>U/U</i>	<i>U/D70G</i>	<i>U/U</i>	<i>U/D70G</i>	<i>U/U</i>
<i>U/A539T</i>	02	40	0	42	02	82
<i>A539T/A539T</i>	01	5	02	5	03	10
<i>U/U</i>	01	92	0	94	01	186

Tabela 5.19. Número e frequência percentual (% \pm EP) dos indivíduos heterozigotos *-116 G/-116 A* e homozigotos *-116 G/-116G* do exon 1, classificados como *U/U*, *U/A539T* e *A539T/A539T* para o polimorfismo *A539T* do exon 4.

Exon 4	Obesos				Controles				Obesos + Controles			
	<i>-116G/-116A</i>		<i>-116G/-116G</i>		<i>-116G/-116A</i>		<i>-116G/-116G</i>		<i>-116G/-116A</i>		<i>-116G/-116G</i>	
	N	% \pm EP	N	% \pm EP	N	% \pm EP	N	% \pm EP	N	% \pm EP	N	% \pm EP
<i>U/U</i>	0	0	54	78,3 \pm 5,0%	02	15,4 \pm 10,0%	50	76,9 \pm 5,2%	02	7,1 \pm 4,9%	104	77,6 \pm 3,6%
<i>U/A539T</i>	14	93,3 \pm 6,4%	13	18,8 \pm 4,7%	10	76,9 \pm 11,7%	13	20,0 \pm 5,0%	24	85,8 \pm 6,6%	26	19,4 \pm 3,4%
<i>A539T/A539T</i>	01	6,7 \pm 6,4%	02	2,9 \pm 2,0%	01	7,7 \pm 7,4%	02	3,1 \pm 2,1%	02	7,1 \pm 4,9%	04	3,0 \pm 1,5%

Tabela 5.20. Frequências dos haplótipos referentes à posição -116 do exon 1 e à mutação *A539T* do exon 4, valores de χ^2 (p), D e D' para o desequilíbrio de ligação entre os dois sítios do gene *BCHE*.

Haplótipos	% \pm E.P.	χ^2 (p)	D	D'
-116A/A539T	8,0 \pm 2,1%	53,8 (<0,0001)	0,064	0,912
-116A/U	0,6 \pm 0,6%			
-116G/A539T	11,1 \pm 2,5%			
-116G/U	80,3 \pm 3,1%			

5.5 ANÁLISES RELATIVAS ÀS MUTAÇÕES *-116A* DO EXON 1 E *A539T* DO EXON 4

A tabela 5.21 mostra médias e variâncias de IMC e atividade da BChE em obesos classificados de acordo com o genótipo relativo à variante *-116A* do exon 1 e valores de $t(p)$ e $F(p)$.

A tabela 5.22 mostra médias e variâncias de IMC e atividade da BChE em obesos classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4.

Valores de $t(p)$ e $F(p)$ para as comparações de médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para obesos classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4 são mostrados na tabela 5.23.

Para os controles classificados de acordo com o genótipo relativo à variante *-116A* do exon 1, a tabela 5.24 mostra médias e variâncias de IMC e atividade da BChE e valores de $t(p)$ e $F(p)$.

Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE, em controles classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4, são mostrados na tabela 5.25.

Os valores de $t(p)$ e de $F(p)$, referentes aos dados apresentados na tabela 5.25, são mostrados na tabela 5.26.

As frequências dos genótipos para a mutação *A539T* nos obesos leves e nos obesos graves e mórbidos reunidos, bem como os valores de $\chi^2(p)$ para as comparações das frequências genotípicas são mostrados na tabela 5.27.

As médias e variâncias e os valores de $t(p)$ e $F(p)$ para as comparações entre as médias e variâncias das variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE dos obesos, classificados de acordo com os genótipos referentes à mutação *A539T*, são mostrados nas tabelas 5.28, 5.29 e 5.30.

As médias, variâncias, amplitudes de variação, valores de $t(p)$ e $F(p)$ para cada quartil de IMC nos obesos classificados como *U/U* e *U/A539T + A539T/A539T* e como *U/U* e *U/A539T* são mostrados nas tabelas 5.31 e 5.32, respectivamente.

A tabela 5.33 mostra os genótipos referentes às mutações *-116A* e *A539T* para os obesos constituintes do quartil superior de IMC.

As tabelas 5.34, 5.35 e 5.36 mostram médias, variâncias e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e as variâncias de peso, altura, IMC, idade e atividade da BChE dentro do grupo de controles, classificados pelos genótipos referentes à variante *A539T*.

A tabela 5.37 mostra as comparações das médias e variâncias de altura entre obesos e controles, classificados como *U/U*, *U/A539T* e *U/A539T + A539T/A539T*.

As comparações da idade e da atividade da BChE entre os dois grupos, classificados pelos genótipos da variante *A539T*, são mostradas nas tabelas 5.38 e 5.39, respectivamente.

As distribuições de peso, altura, IMC e atividade da BChE em obesos classificados de acordo com a mutação *A539T* são mostradas nas figuras 5.22, 5.23, 5.24 e 5.25, respectivamente. Para os controles, as mesmas distribuições são mostradas nas figuras 5.26, 5.27, 5.28 e 5.29.

Tabela 5.21. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE em obesos classificados de acordo com o genótipo relativo à variante *-116A* do exon 1 e valores de t (p) e F (p).

	IMC				
Genótipos	N	Média ± EP	s ²	t (p)	F (p)
<i>−116G/−116G</i>	71	31,95 ± 0,19	2,44	2,73 (0,008)*	3,24 (0,001)*
<i>−116G/−116A</i>	15	33,39 ± 0,73	7,92		
	Atividade da BChE				
<i>−116G/−116G</i>	71	6,45 ± 0,33	7,93	2,37 (0,02)*	3,01 (0,03)*
<i>−116G/−116A</i>	15	4,60 ± 0,43	2,63		

* Diferença significativa.

Tabela 5.22. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para obesos classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4.

Genótipos	IMC			Atividade da BChE		
	N	Média ± EP	s ²	N	Média ± EP	s ²
<i>-116G/-116G; U/U</i>	54	32,39 ± 0,33	5,90	54	6,34 ± 0,37	7,29
<i>-116G/-116G; U/A539T</i>	13	32,25 ± 0,45	2,24	13	6,64 ± 0,10	3,60
<i>-116G/-116G; A539T/A539T</i>	02	31,14 ± 0,71	0,99	02	8,49 ± 1,24	3,10
<i>-116G/-116A; A539T/A539T</i>	01	38,02	-	01	4,65	-
<i>-116G/-116A; U/A539T</i>	13	33,06 ± 0,69	6,73	13	4,50 ± 0,46	2,73

Tabela 5.23. Valores de t (p) e F (p) para as comparações de médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para obesos classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4.

Genótipos Comparados ¹	IMC		Atividade da BChE	
	t (p)	F (p)	t (p)	F (p)
<i>-116G/-116G; U/U</i> (54) x <i>-116G/-116G; U/A539T</i> (13)	0,44 (0,66)	2,87 (0,04)*	0,34 (0,73)	1,78 (0,15)
<i>-116G/-116G; U/U</i> (54) x <i>-116G/-116A; U/A539T</i> (13)	2,18 (0,03)*	1,34 (0,43)	2,34 (0,02)*	2,66 (0,07)
<i>-116G/-116G; U/A539T</i> (13) x <i>-116G/-116A; U/A539T</i> (13)	1,28 (0,19)	3,18 (0,03)*	1,94 (0,06)	4,73 (0,01)*

¹Número de indivíduos entre parênteses. * Diferença significativa.

Tabela 5.24. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE em controles classificados de acordo com o genótipo relativo à variante *-116A* do exon 1 e valores de t (p) e F (p).

	IMC				
Genótipos	N	Média ± EP	s ²	t (p)	F (p)
<i>−116G/−116G</i>	65	23,04 ± 0,15	1,48	0,71 (0,48)	1,05 (0,82)
<i>−116G/−116A</i>	13	22,77 ± 0,35	1,53		
	Atividade da BChE				
<i>−116G/−116G</i>	65	4,92 ± 0,20	0,20	2,03 (0,04)*	3,05 (0,06)
<i>−116G/−116A</i>	13	3,92 ± 0,27	0,83		

* Diferença significativa.

Tabela 5.25. Médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para controles classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4.

Genótipos	IMC			Atividade da BChE		
	N	Média ± EP	s ²	N	Média ± EP	s ²
<i>-116G/-116G; U/U</i>	50	22,89 ± 0,16	1,29	50	4,98 ± 0,23	2,71
<i>-116G/-116G; U/A539T</i>	13	23,43 ± 0,41	2,21	13	4,82 ± 0,41	2,22
<i>-116G/-116G; A539T/A539T</i>	02	24,05 ± 0,11	0,02	02	4,08 ± 0,37	0,28
<i>-116G/-116A; U/U</i>	02	21,94 ± 0,27	0,14	02	3,86 ± 0,18	0,06
<i>-116G/-116A; U/A539T</i>	10	22,79 ± 0,45	1,86	10	3,97 ± 0,35	1,12
<i>-116G/-116A; A539T/A539T</i>	01	22,77	-	01	3,73	-

Tabela 5.26. Valores de t (p) e F (p) para as comparações de médias e variâncias de IMC e atividade da BChE para controles classificados de acordo com os genótipos relativos às variantes *-116A* do exon 1 e *A539T* do exon 4.

Genótipos Comparados ¹	IMC		Atividade da BChE	
	t (p)	F (p)	t (p)	F (p)
<i>-116G/-116G; U/U</i> (50) x <i>-116G/-116G; U/A539T</i> (13)	1,42 (0,16)	1,72 (0,18)	0,31 (0,76)	1,21 (0,74)
<i>-116G/-116G; U/U</i> (50) x <i>-116G/-116A; U/A539T</i> (10)	0,25 (0,80)	1,44 (0,41)	1,75 (0,08)	2,41 (0,19)
<i>-116G/-116G; U/A539T</i> (13) x <i>-116G/-116A; U/A539T</i> (10)	1,02 (0,31)	1,19 (0,82)	2,76 (0,01)*	2,97 (0,06)

¹ Número de indivíduos entre parênteses.

Tabela 5.27. Valores de χ^2 (p) para as comparações das frequências genótípicas para a variante *A539T* nos obesos leves e nos obesos graves e mórbidos reunidos.

Genótipos	Obesos Leves		Obesos Graves + Mórbidos		χ^2 (p)
	N	% \pm EP	N	% \pm EP	
<i>U/A539T</i>	36	31,30 \pm 2,55%	07	25,93 \pm 5,96%	0,25 (p > 0,75)
<i>A539T / A539T</i>	05	4,35 \pm 1,35%	01	3,70 \pm 2,57	
<i>U/U</i>	74	64,35 \pm 3,16%	19	70,37 \pm 6,21%	
<i>U/U</i>	74	64,35 \pm 3,16%	19	70,37 \pm 6,21%	0,14 (0,71)
<i>U/A539T + A539T / A539T</i>	41	35,65 \pm 3,16%	08	29,63 \pm 6,21%	

Tabela 5.28. Média (\pm EP) e variância de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos obesos classificados de acordo com a presença ou ausência da variante *A539T* e valores de t (p) e F (p).

Variáveis	<i>U/U</i>			<i>U/A539T + A539T/ A539T</i>			t (p)	F (p)
	N	Média \pm EP	s ²	N	Média \pm EP	s ²		
Peso (kg)	93	97,45 \pm 1,26	146,99	49	95,92 \pm 1,25	76,41	0,78 (0,43)	1,92 (0,014)*
Altura (cm)	93	171,55 \pm 0,83	64,82	49	171,82 \pm 0,84	34,57	0,21 (0,84)	1,87 (0,018)*
IMC (kg/m ²)	93	33,10 \pm 0,35	11,48	49	32,47 \pm 0,31	4,87	1,17 (0,24)	2,35 (0,001)*
Idade (anos)	93	35,88 \pm 0,95	84,08	49	37,49 \pm 1,49	108,17	0,91 (0,36)	1,29 (0,30)
Atividade da BChE (KU/L)	93	6,64 \pm 0,28	7,26	47 ¹	5,67 \pm 0,33	5,36	2,10 (0,03)*	1,35 (0,26)

* Diferença significativa. ¹ Foram excluídos dois indivíduos com valores extremos de atividade da BChE.

Tabela 5.29. Média (\pm EP) e variância de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos obesos classificados como *U/A539T* e *A539T/A539T* e valores de t (p) e F (p) para comparações entre médias e variâncias.

Variáveis	<i>U/A539T</i>			<i>A539T/A539T</i>			t (p)	F (p)
	N	Média \pm EP	s ²	N	Média \pm EP	s ²		
Peso (kg)	43	96,02 \pm 1,29	71,74	06	95,17 \pm 4,66	130,17	0,22 (0,82)	1,81 (0,26)
Altura (cm)	43	171,77 \pm 0,88	33,23	06	172,17 \pm 2,96	52,57	0,15 (0,88)	1,58 (0,37)
IMC (kg/m ²)	43	32,53 \pm 0,32	4,46	06	32,10 \pm 1,23	9,11	0,46 (0,64)	2,04 (0,18)
Idade (anos)	43	37,48 \pm 1,58	107,78	06	37,50 \pm 4,71	133,10	0,002 (0,99)	1,23 (0,62)
Atividade da BChE (KU/L)	43	6,16 \pm 0,50	10,79	06	5,78 \pm 0,98	5,82	0,27 (0,78)	1,85 (0,51)

Tabela 5.30. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e variâncias de obesos *U/U x U/A539T* e *U/U x A539T/A539T*.

Variáveis	<i>U/U x U/A539T</i>		<i>U/U x A539T /A539T</i>	
	t (p)	F (p)	t (p)	F (p)
Peso (kg)	0,69 (0,49)	2,05 (0,01)*	0,45 (0,65)	1,13 (0,99)
Altura (cm)	0,16 (0,87)	1,95 (0,02)*	0,18 (0,85)	1,23 (0,91)
IMC (kg/m ²)	1,02 (0,31)	2,60 (0,001)*	0,72 (0,47)	1,26 (0,88)
Idade (anos)	0,91 (0,36)	1,28 (0,32)	0,41 (0,68)	1,58 (0,34)
Atividade da BChE (KU/L)	2,76 (0,007)	1,49 (0,12)	0,76 (0,45)	1,24 (0,90)

* Diferença significativa.

Tabela 5.31. Médias, variâncias, amplitudes de variação e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre obesos classificados como *U/U* e *U/A539T + A539T/A539T* para cada quartil de IMC.

Quartis	<i>U/U</i>			<i>U/A539T + A539T/A539T</i>			t (p)	F (p)
	Média ± EP	s ²	AV	Média ± EP	s ²	AV		
Primeiro	30,45 ± 0,06	0,08	30,04-30,82	30,37 ± 0,04	0,02	30,10-30,67	0,94 (0,35)	3,71 (0,02)*
Segundo	31,40 ± 0,08	0,13	30,82-31,95	31,18 ± 0,09	0,10	30,74-31,62	1,73 (0,09)	1,32 (0,64)
Terceiro	32,64 ± 0,11	0,29	31,96-33,42	32,74 ± 0,23	0,63	31,64-33,96	0,43 (0,67)	2,16 (0,12)
Quarto	38,04 ± 0,69	11,11	33,59-45,68	35,78 ± 0,35	1,46	34,29-38,06	2,26 (0,03)*	7,61 (0,001)*

* Diferença significativa.

Tabela 5.32. Médias, variâncias, amplitudes de variação (AV) e valores de t (p) e F (p) para as comparações entre obesos classificados como *U/U* e *U/A539T* para cada quartil de IMC.

Quartis	<i>U/U</i>			<i>U/A539T</i>			t (p)	F (p)
	Média ± EP	s ²	AV	Média ± EP	s ²	AV		
Primeiro	30,45 ± 0,06	0,08	30,04-30,82	30,42 ± 0,05	0,03	30,12-30,74	0,32 (0,74)	3,74 (0,10)
Segundo	31,40 ± 0,08	0,13	30,82-31,95	31,18 ± 0,09	0,10	30,74-31,56	1,65 (0,10)	1,64 (0,44)
Terceiro	32,64 ± 0,11	0,29	31,96-33,42	32,82 ± 0,23	0,60	31,64-33,96	0,73 (0,44)	2,08 (0,14)
Quarto	38,04 ± 0,69	11,11	33,59-45,68	35,57 ± 0,31	1,04	34,29-37,87	2,38 (0,02)*	10,72 (0,0005)*

* Diferença significativa.

Tabela 5.33. Genótipos referentes à mutação *-116A* do exon 1 e à mutação *A539T* do exon 4 nos obesos pertencentes ao quartil superior de IMC.

Exon 1	Exon 4		
	<i>U/U</i>	<i>U/A539T</i>	<i>A539T/A539T</i>
<i>-116G/-116G</i>	09	03	0
<i>-116G/-116A</i>	-	05	0
Não genotipados	14	04	0

Tabela 5.34. Média (\pm EP) e variância de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos controles classificados de acordo com a presença ou ausência da variante *A539T* e valores de t (p) e F (p) para comparações entre médias e variâncias.

Variáveis	<i>U/U</i>			<i>U/A539T + A539T/A539T</i>			t (p)	F (p)
	N	Média \pm EP	s ²	N	Média \pm EP	s ²		
Peso	96	68,80 \pm 0,72	50,18	49	68,71 \pm 1,10	59,25	0,07 (0,94)	1,18 (0,49)
Altura	96	172,73 \pm 0,77	56,91	49	171,69 \pm 0,97	46,05	0,81 (0,43)	1,24 (0,42)
IMC	96	23,01 \pm 0,12	1,43	49	23,24 \pm 0,20	1,91	1,03 (0,30)	1,33 (0,23)
Idade	96	36,21 \pm 1,02	99,72	49	36,18 \pm 1,21	72,32	0,01 (0,99)	1,38 (0,22)
Atividade da BChE	95 ¹	4,85 \pm 0,14	1,89	48 ²	4,23 \pm 0,16	1,29	2,68 (0,008)*	1,46 (0,15)

¹ Foi excluído um indivíduo com valor extremo de atividade. ² Foi excluído um indivíduo com valor extremo de atividade.

* Diferença significativa.

Tabela 5.35. Média (\pm EP), variância e amplitude de variação (AV) de variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), idade e atividade da BChE (KU/L) nos controles classificados *U/A539T* e *A539T/A539T*.

Variáveis	<i>U/A539T</i>			<i>A539T/A539T</i>			t (p)	F (p)
	N	Média \pm EP	s ²	N	Média \pm EP	s ²		
Peso	42	68,55 \pm 1,22	62,20	07	69,71 \pm 2,61	47,57	0,37 (0,71)	1,31 (0,80)
Altura	42	171,67 \pm 1,09	50,18	07	171,86 \pm 1,91	25,48	0,07 (0,95)	1,97 (0,40)
IMC	42	23,19 \pm 0,21	1,94	07	23,56 \pm 0,52	1,91	0,65 (0,52)	1,02 (1,00)
Idade	42	35,76 \pm 1,24	64,28	07	38,71 \pm 4,71	130,57	0,85 (0,40)	2,03 (0,17)
Atividade da BChE	42	4,51 \pm 0,29	3,65	07	3,94 \pm 0,27	0,50	0,78 (0,44)	7,30 (0,02)*

* Diferença significativa.

Tabela 5.36. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre as médias e variâncias de peso, altura, IMC, idade e atividade da BChE em controles *U/U x U/A539T* e *U/U x A539T/A539T*.

Variáveis	<i>U/U x U/A539T</i>		<i>U/U x A539T/A539T</i>	
	t (p)	F (p)	t (p)	F (p)
Peso	0,18 (0,85)	1,24 (0,39)	0,33 (0,74)	1,05 (0,99)
Altura	0,77 (0,44)	1,13 (0,66)	0,30 (0,76)	2,23 (0,31)
IMC	0,75 (0,45)	1,35 (0,23)	1,15 (0,25)	1,33 (0,50)
Idade	0,26 (0,80)	1,55 (0,12)	0,63 (0,53)	1,31 (0,52)
Atividade da BChE	2,37 (0,02)*	1,54 (0,09)	1,67 (0,09)	4,74 (0,06)

Tabela 5.37. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre médias e variâncias de altura entre obesos e controles classificados de acordo com os genótipos relativos à variante *A539T*.

Obesos	Controles		
Genótipos comparados	<i>U/ A539T</i>	<i>U/U</i>	<i>U/A539T + A539T/A539T</i>
<i>U/A539T</i>	t = 0,07 (0,94); F = 1,51 (0,19)	t = 0,74 (0,46); F = 1,71 (0,06)	—
<i>U/U</i>	t = 0,08 (0,93); F = 1,29 (0,36)	t = 1,04 (0,30); F = 1,14 (0,53)	t = 0,11 (0,91); F = 1,41 (0,19)
<i>U/A539T + A539T/A539T</i>	—	t = 0,74 (0,46); F = 1,64 (0,06)	t = 0,09 (0,93); F = 1,33 (0,32)

Tabela 5.38. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre médias e variâncias de idade entre obesos e controles classificados de acordo com os genótipos relativos à variante *A539T*.

Obesos	Controles		
Genótipos comparados	<i>U/A539T</i>	<i>U/U</i>	<i>U/A539T + A539T/A539T</i>
<i>U/A539T</i>	t = 0,86 (0,39); F = 1,68 (0,10)	t = 0,69 (0,49); F = 1,08 (0,74)	—
<i>U/U</i>	t = 0,07 (0,94); F = 1,30 (0,34)	t = 0,23 (0,81); F = 1,19 (0,41)	t = 0,19 (0,85); F = 1,16 (0,57)
<i>U/A539T + A539T/A539T</i>	—	t = 0,72 (0,47); F = 1,08 (0,72)	t = 0,68 (0,50); F = 1,50 (0,17)

Tabela 5.39. Valores de t (p) e F (p) para as comparações entre médias e variâncias de atividade da BChE entre obesos e controles classificados de acordo com os genótipos relativos à variante *A539T*.

Obesos	Controles		
Genótipos comparados	<i>U/ A539T</i>	<i>U/U</i>	<i>U/A539T + A539T/A539T</i>
<i>U/A539T</i>	t = 2,82 (0,006)*; F = 2,96 (7x10 ⁻⁴)*	t = 3,03 (0,003)*; F = 4,56 (10 ⁻⁶)*	—
<i>U/U</i>	t = 4,60 (10 ⁻⁵)*; F = 1,99 (0,015)*	t = 5,39 (10 ⁻⁵)*; F = 3,06 (10 ⁻⁵)*	t = 5,13 (10 ⁻⁵)*; F = 2,25 (0,002)*
<i>U/A539T + A539T/A539T</i>	—	t = 3,05 (0,003)*; F = 4,25 (10 ⁻⁵⁶)*	t = 3,23 (0,02)*; F = 3,13 (10 ⁻⁴)*

* Diferença significativa.

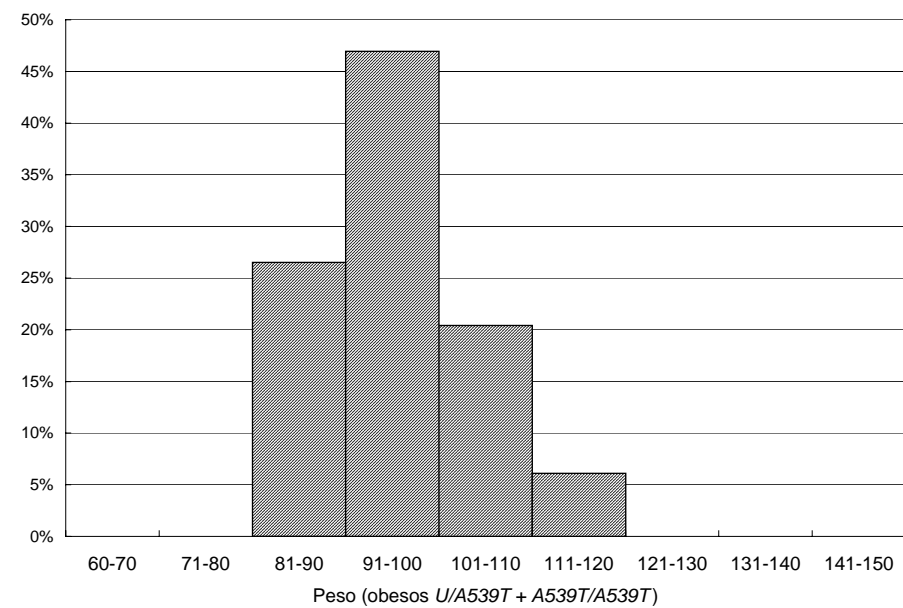
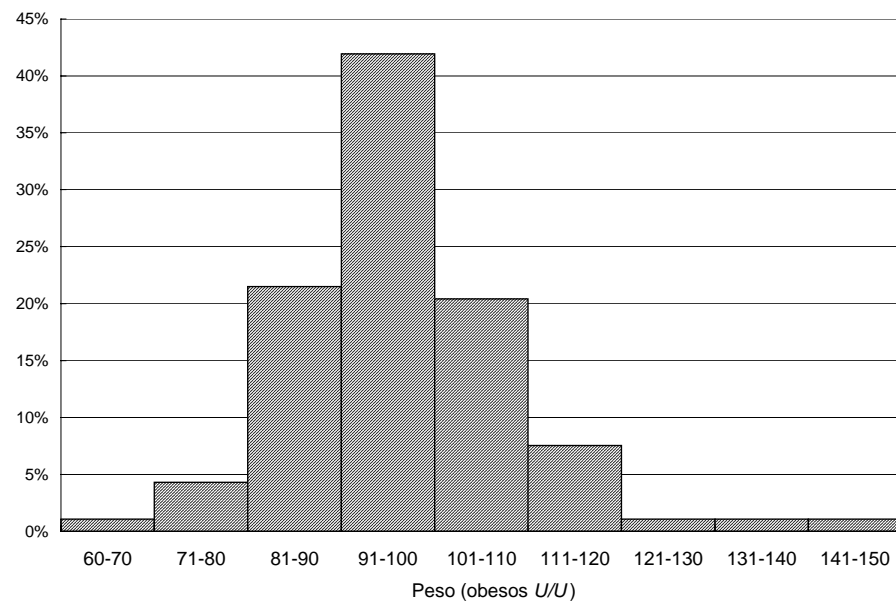


Figura 5.22. Distribuição de peso (kg) de 93 obesos *U/U* e 49 obesos *U/A539 + A539/A539*.

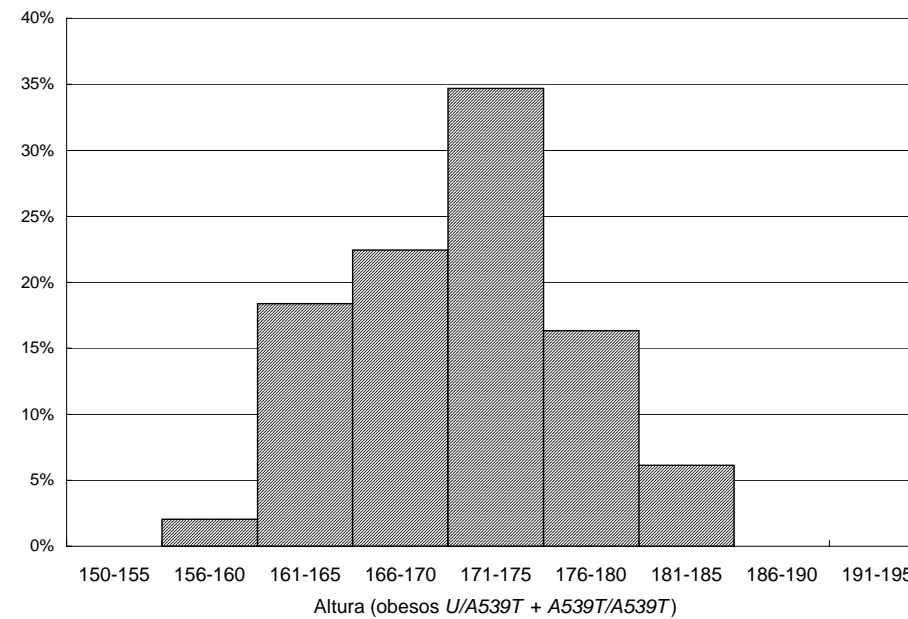
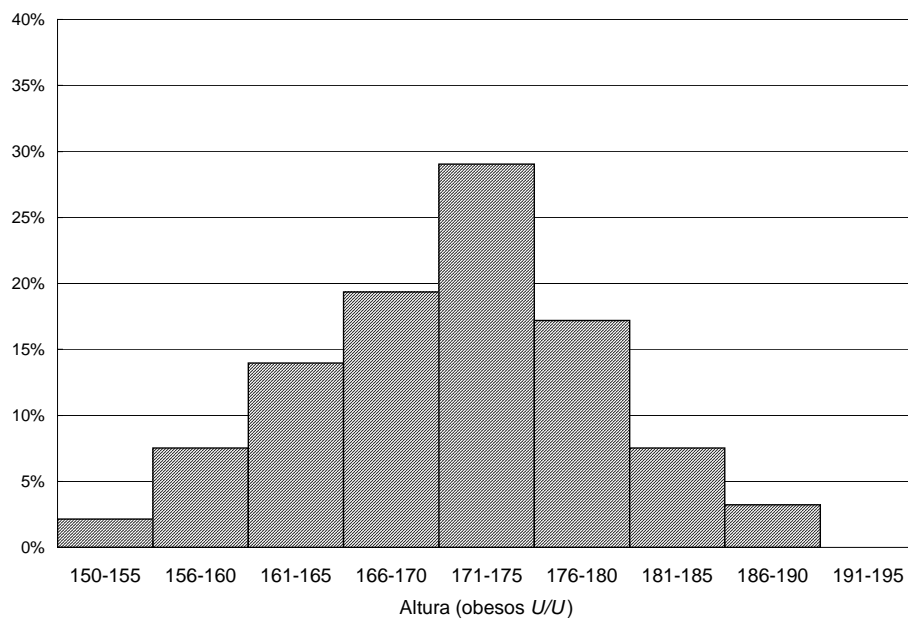


Figura 5.23. Distribuição de altura (cm) em 93 obesos *U/U* e 49 obesos *U/A539 + A539/A539*.

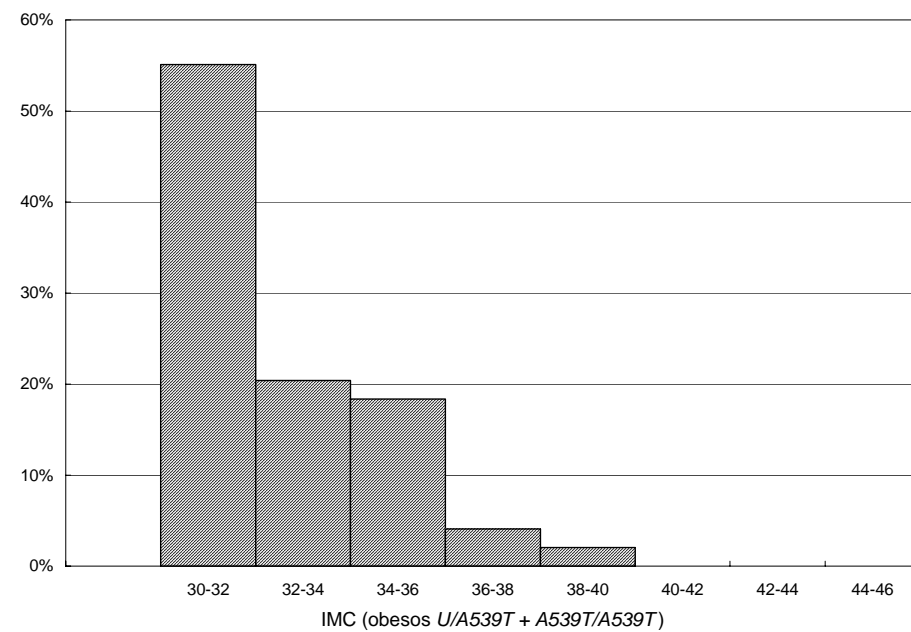
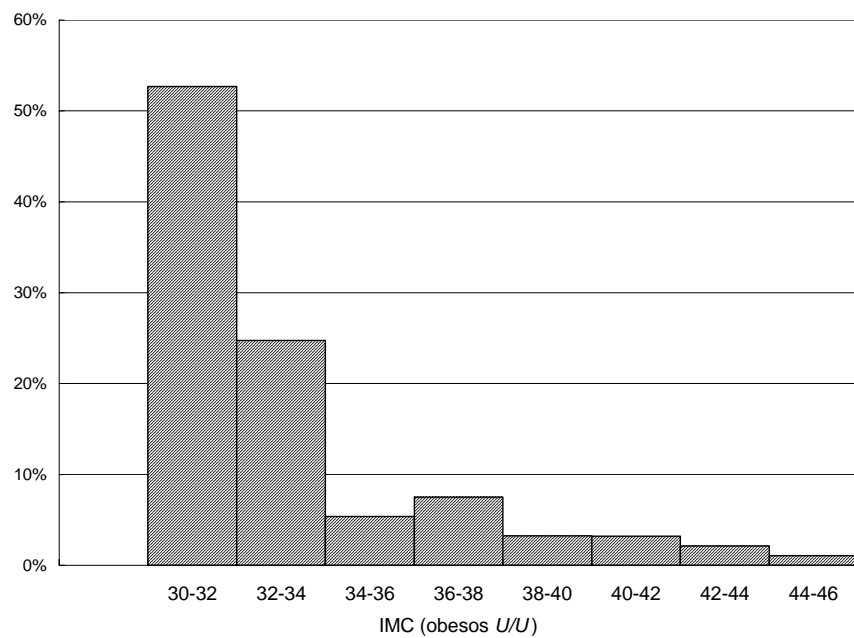


Figura 5.24. Distribuição de IMC em 93 obesos *U/U* e 49 obesos *U/A539 + A539/ A539*.

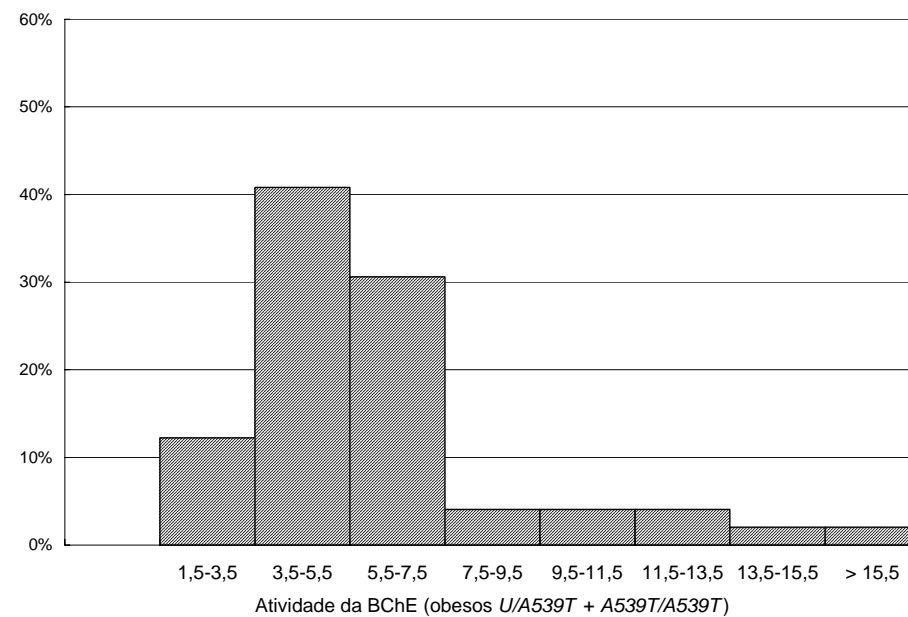
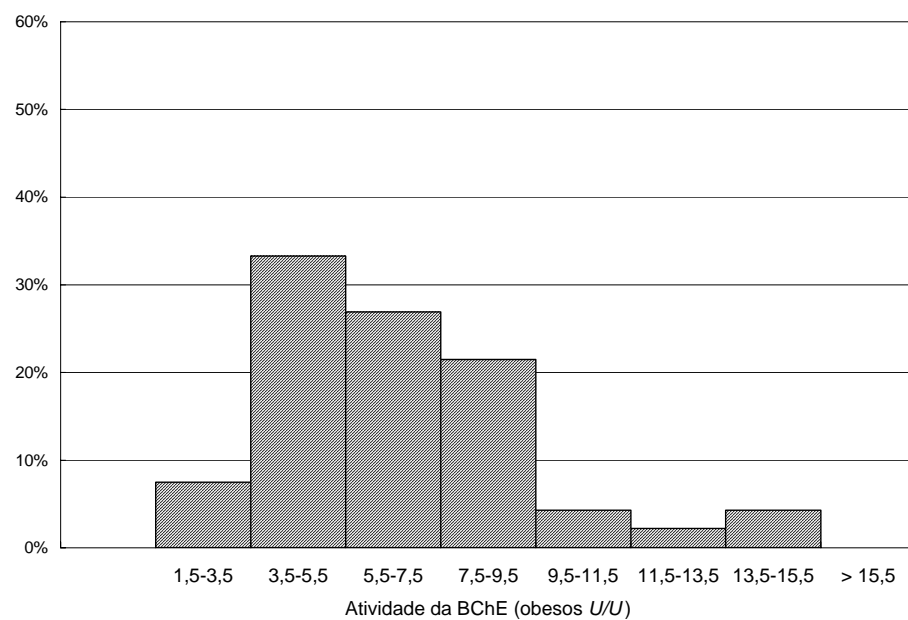


Figura 5.25. Distribuição da atividade da BChE em 93 obesos *U/U* e 49 obesos *U/A539T + A539T/A539T*.

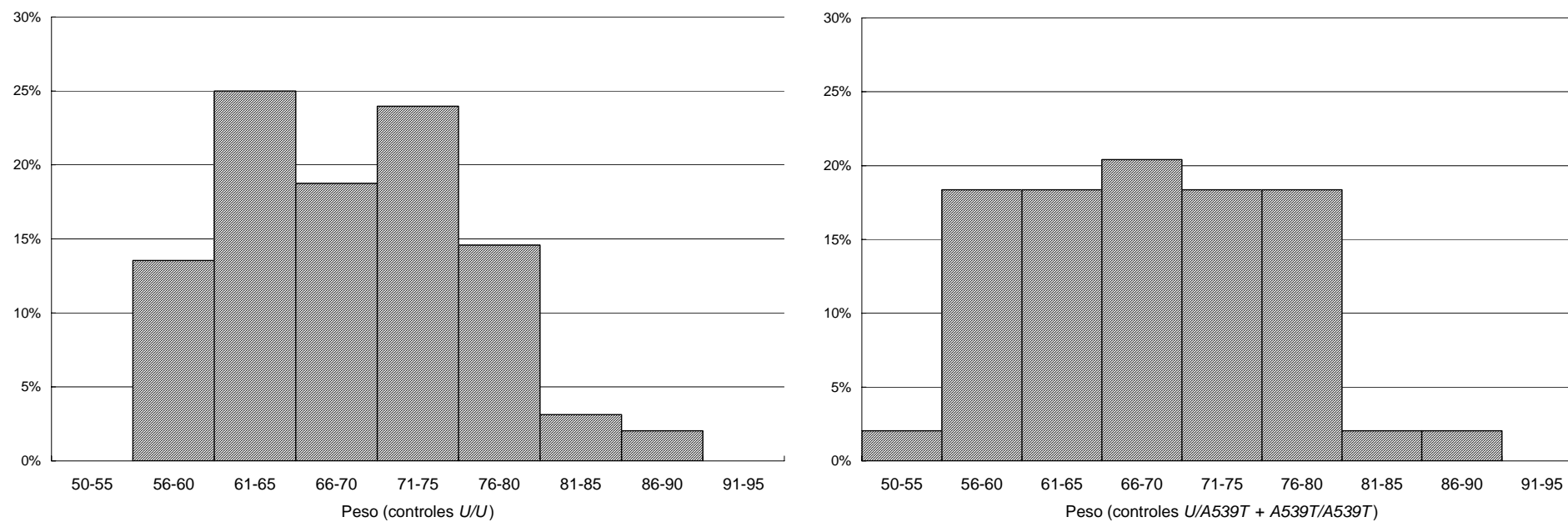


Figura 5.26. Distribuição de peso (kg) em 96 controles *U/U* e 49 controles *U/A539 + A539/A539*.

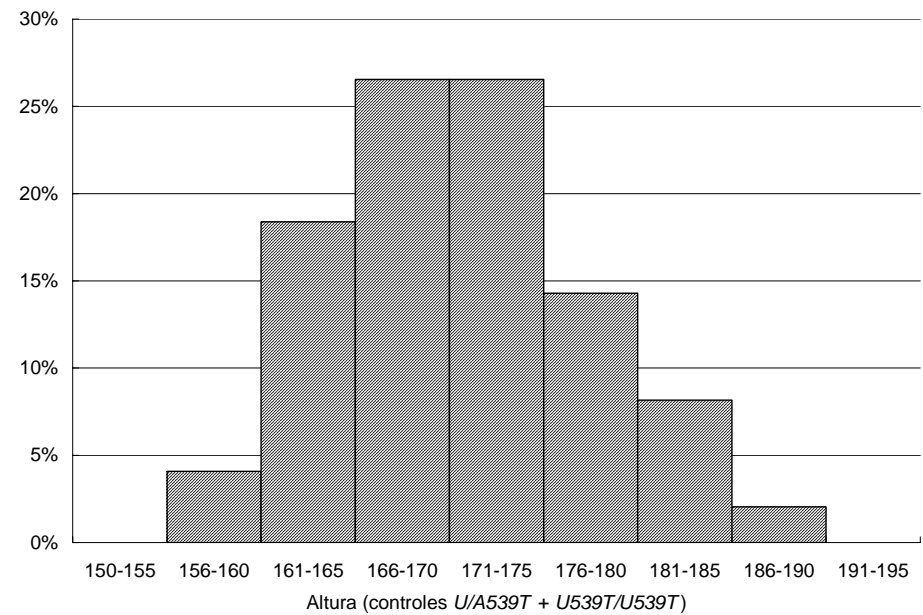
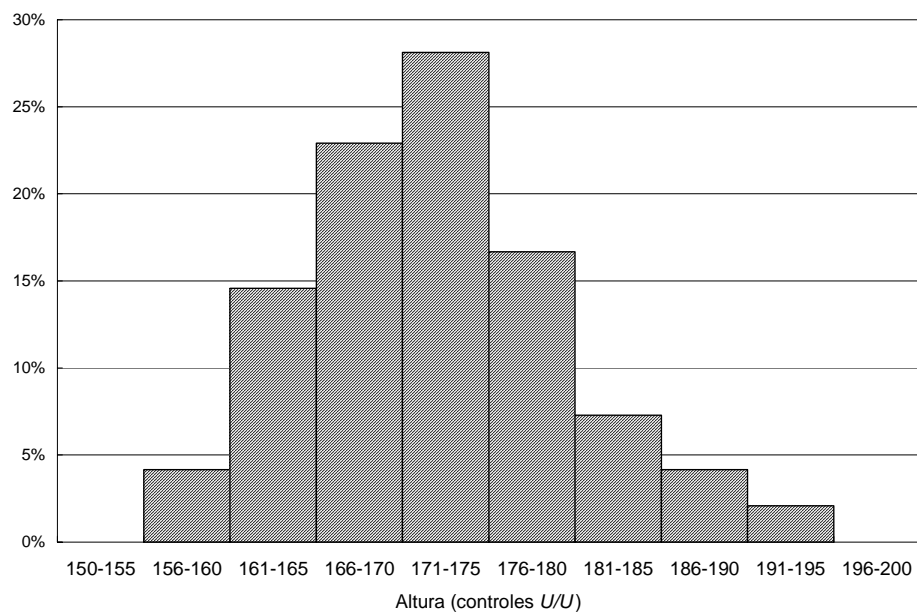


Figura 5.27. Distribuição de altura (cm) em 96 controles *U/U* e 49 controles *U/A539 + A539/A539*.

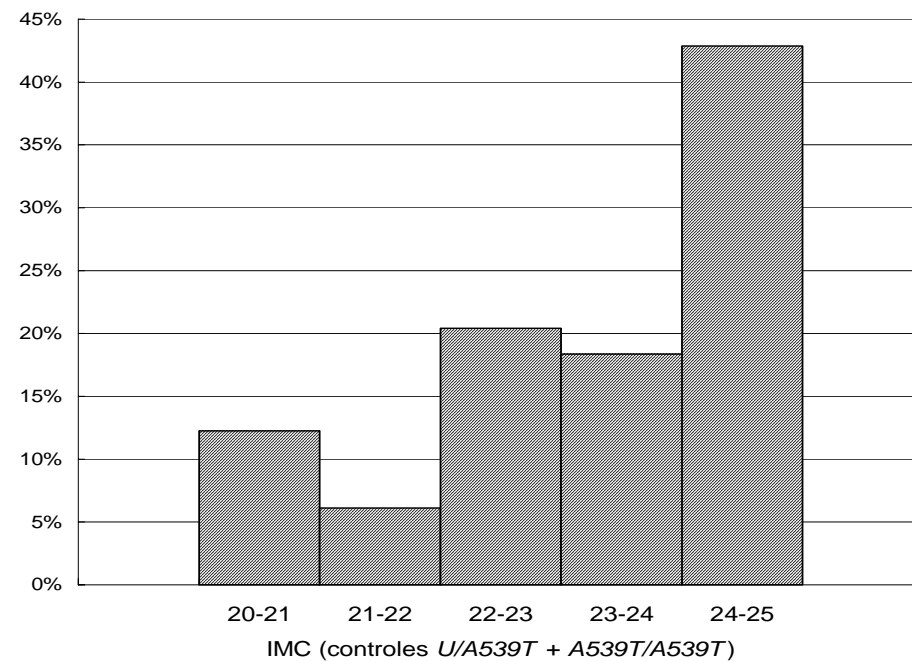
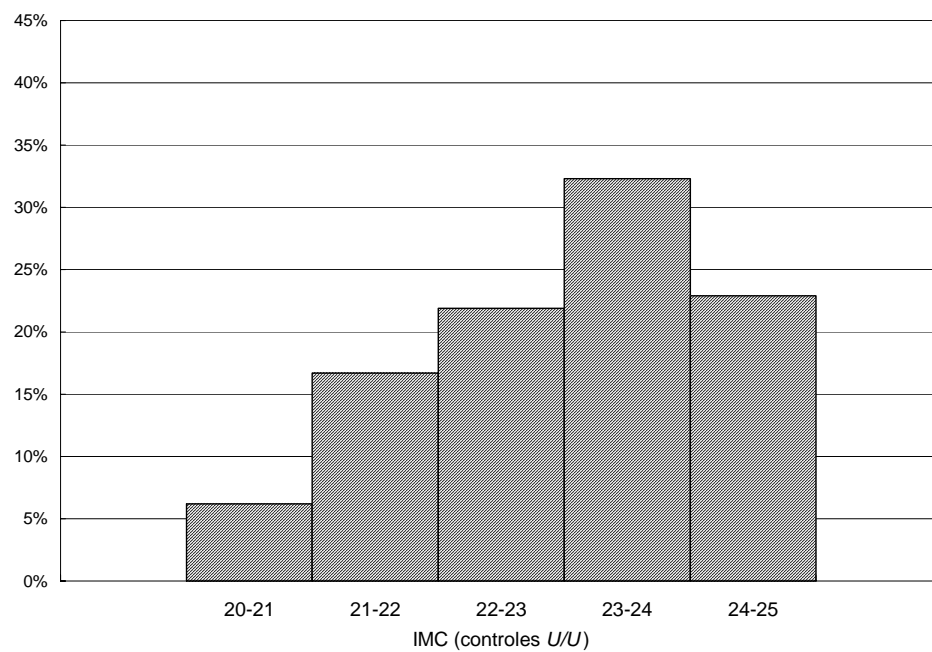


Figura 5.28. Distribuição de IMC em 96 controles *U/U* e 49 controles *U/A539 + A539/ A539*.

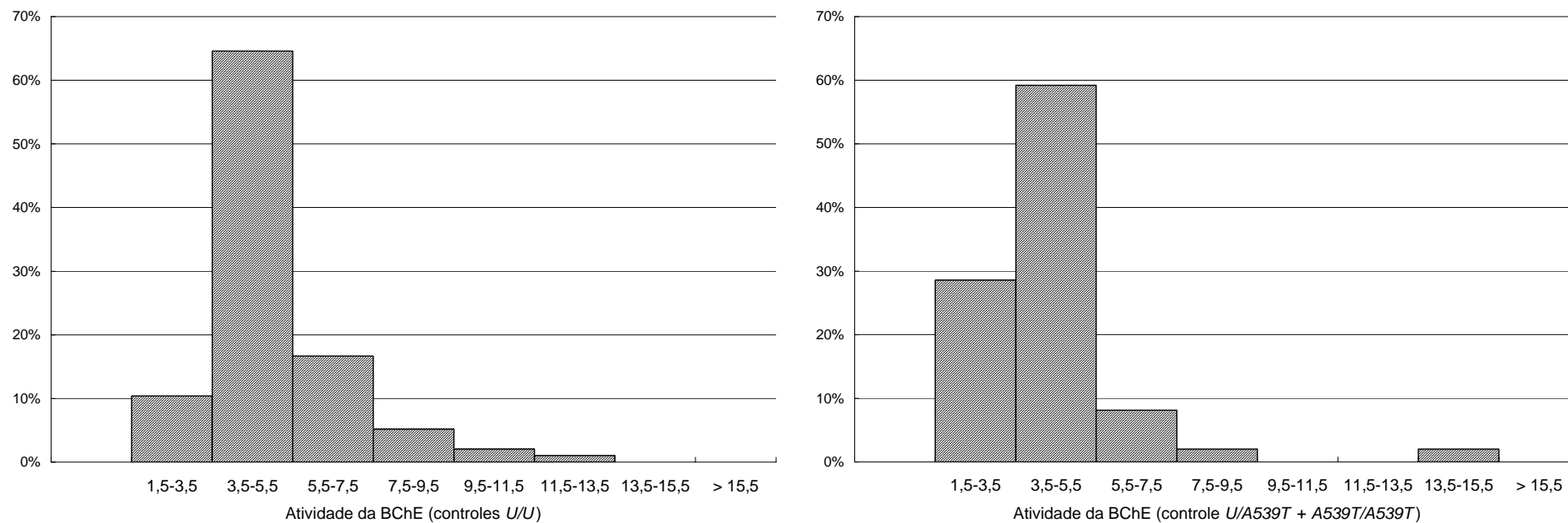


Figura 5.29. Distribuição de atividade da BChE em 96 controles *U/U* e 49 controles *U/A539 + A539/A539*.

6 DISCUSSÃO

6.1 AMOSTRA TOTAL DE DOADORES DE SANGUE

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do IBGE realizada entre 2002 e 2003, o déficit de peso atinge 2,4% da população de Curitiba. Na amostra de doadores de sangue, a categoria de déficit de peso corresponde a 0,4%, estando sub-representada com relação à população curitibana ($\chi^2_{(1)} = 45,83$; $p < 0,0001$). A menor frequência de indivíduos com déficit de peso entre os doadores de sangue pode ser explicada pela imposição de um peso mínimo (50 kg) para que uma pessoa possa doar sangue e também pelas melhores condições de saúde que, de modo geral, caracterizam os doadores de sangue.

Os doadores de sangue apresentam uma frequência significativamente maior de indivíduos com peso normal (51,4%; $\chi^2_{(1)} = 24,63$; $p < 0,0001$) do que a população curitibana (43,8%; IBGE, 2003). Na amostra de doadores de sangue, as frequências de indivíduos com excesso de peso e obesidade (37,7% e 10,5%, respectivamente) são significativamente menores que aquelas estimadas pelo IBGE (2003) para a população de Curitiba (41,4% e 12,4%, respectivamente; $\chi^2_{(1)} = 6,71$; $p = 0,01$ e $\chi^2_{(1)} = 7,9$; $p = 0,005$, respectivamente). A maior frequência de indivíduos com peso normal e a diminuição das frequências de excesso de peso e obesidade, observadas entre os doadores de sangue, provavelmente decorrem das características próprias de doadores de sangue, como condições gerais de saúde e maior prevalência de indivíduos com até 34 anos (65,4%). A figura 6.1 mostra as distribuições das categorias déficit de peso, peso normal, excesso de peso e obesidade para a população curitibana (IBGE, 2003) e para a amostra de doadores de sangue.

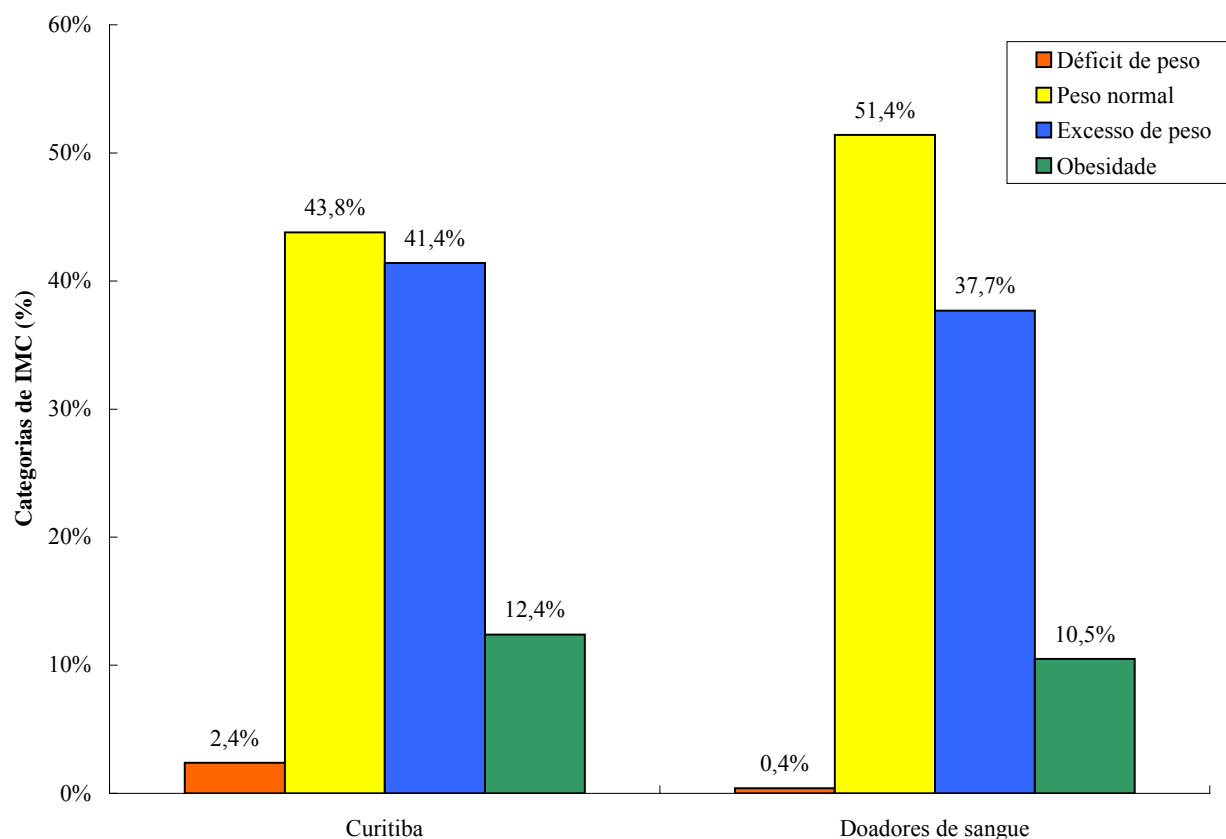


Figura 6.1. Percentagens das categorias déficit de peso, peso normal, excesso de peso e obesidade para a população de Curitiba (IBGE, 2003) e para a amostra de doadores de sangue.

Na população brasileira não há diferença significativa entre homens e mulheres quanto à proporção de indivíduos com excesso de peso, enquanto que na amostra de doadores de sangue o excesso de peso é mais frequente entre os homens (38,9% para 32,7% entre as mulheres, $\chi^2_{(1)} = 9,07$; $p = 0,002$). Considerando que a proporção de indivíduos com excesso de peso tende a aumentar com o aumento da idade e que a amostra de doadores de sangue é composta por indivíduos cuja média de idade é de 31,4 anos ($\pm 0,17$ anos), a maior frequência de homens entre os doadores de sangue (79,9% homens e 20,1% mulheres) pode levar a essa diferença, pois a prevalência de

excesso de peso tende a aumentar com a idade de modo mais rápido para os homens do que para as mulheres (ELIA, 2001).

Ao contrário do padrão observado para o excesso de peso, na amostra de doadores de sangue não há diferença significativa na proporção de obesos entre homens e mulheres (10,6% e 10,1%, respectivamente; $\chi^2_{(1)} = 0,04$; $p = 0,85$). De acordo com o IBGE (2003) a proporção de obesas entre as mulheres é de 13,1%, significativamente maior do que entre as mulheres doadoras de sangue ($\chi^2_{(1)} = 7,46$; $p = 0,006$). A frequência de homens obesos na população brasileira é de 8,9% (IBGE, 2003), significativamente menor que aquela observada entre os doadores de sangue (10,6%; $\chi^2_{(1)} = 5,35$; $p = 0,02$). Desse modo, embora não exista diferença na proporção de obesos para homens e mulheres doadores de sangue, os dois sexos demonstram desvios opostos com relação à população brasileira. A proporção de mulheres obesas é menor e a proporção de homens obesos é maior entre os doadores de sangue do que na população brasileira. Esses desvios podem, em parte, ser explicados pelas características da população curitibana, que se diferencia da população brasileira nas proporções de obesos entre mulheres e homens. Na população de Curitiba a proporção de obesos entre as mulheres é de 12,6% e entre os homens é de 12,1% (IBGE, 2003), ambas significativamente mais altas que aquelas observadas na amostra de doadores de sangue ($\chi^2_{(1)} = 4,85$; $p = 0,03$ e $\chi^2_{(1)} = 5,35$; $p = 0,02$). De acordo com o IBGE (2003), entre os homens, o aumento da renda está positivamente associado ao aumento de peso, podendo justificar a maior prevalência de obesidade entre os homens curitibanos em relação à população brasileira.

O efeito da idade sobre o peso pode ser verificado quando se observam as proporções de cada categoria de IMC por faixa etária (figura 5.2). Na amostra de doadores de sangue, assim como para a população brasileira e curitibana (IBGE, 2003), as comparações das proporções de indivíduos com peso normal, excesso de peso e obesidade, mostraram que o aumento da idade leva a um aumento da proporção de indivíduos com excesso de peso e obesidade e à conseqüente diminuição de indivíduos com peso normal (tabela 5.2). A figura 6.2 mostra as proporções de peso normal, excesso de peso e obesidade por faixa etária para a população brasileira.

As comparações das médias de idade, dentro do grupo de doadores de sangue (figura 5.3 e tabela 5.3), mostram que as médias do IMC aumentam juntamente com a idade, de modo que os indivíduos obesos são mais velhos que aqueles com excesso de peso, que, por sua vez, têm média de idade maior que os de peso normal. Idade e IMC estão positivamente correlacionados na amostra de doadores de sangue ($r = 0,36$; $p < 0,001$), apresentando a mesma tendência observada na população brasileira (IBGE, 2003) e em outros países (LEHMANN e BASEY, 1996; WAALER, 1998).

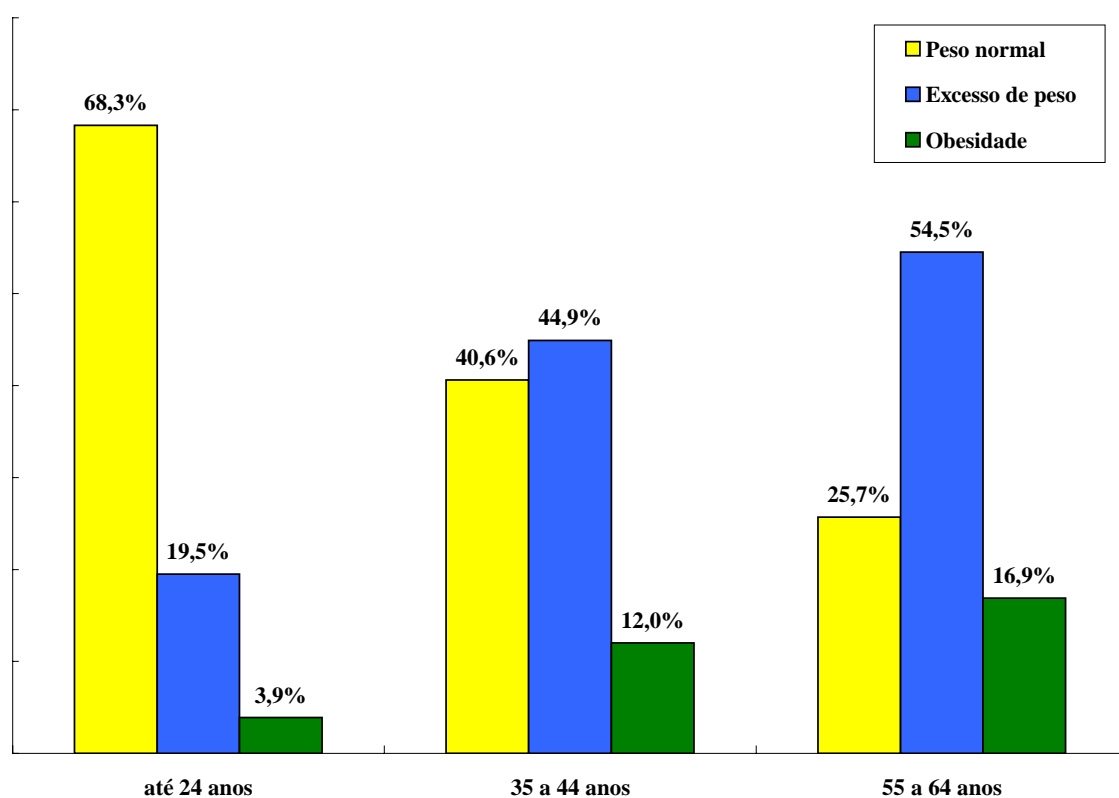


Figura 6.2. Proporções de peso normal, excesso de peso e obesidade, por faixa etária para a população brasileira (IBGE, 2003).

A obesidade existe em praticamente todas as populações humanas, e, nas sociedades em desenvolvimento, sua prevalência tem aumentado em decorrência do processo de envelhecimento da população (ROSMOND, 2004). A massa muscular começa a diminuir entre 30 e 40 anos, continuando ao longo do processo de envelhecimento. A gordura corporal, por sua vez, aumenta ao longo de toda a vida adulta. Como, com o aumento da idade, gordura passa a substituir massa magra, indivíduos mais velhos possuem maior proporção de gordura visceral que aqueles mais jovens com o mesmo IMC (BAUMGARTER et al., 1995). A relação entre a idade e o aumento de peso é complexa, pois o processo de envelhecimento é, em parte, o resultado cumulativo de diversas alterações metabólicas, como mudanças hormonais, redução na utilização de ácidos graxos e resistência à leptina. Uma das alterações biológicas do envelhecimento é a queda do gasto energético total, que decorre da diminuição da atividade física e da taxa metabólica basal. As diferenças nos efeitos da idade para homens e mulheres podem ser, em parte, explicadas pela diminuição mais acelerada no gasto energético total nos homens (165kcal/década, para 103kcal/década para as mulheres; ELIA, 2001).

Entre os homens Euro-brasileiros obesos não existe diferença significativa entre as médias de idade de obesos leves, graves e mórbidos. A ausência de diferença entre as médias de idade pode decorrer do número reduzido de indivíduos com obesidade grave e mórbida (N = 23 e N = 07, respectivamente).

Na amostra de doadores de sangue não há diferença significativa na proporção de obesidade e excesso de peso entre Afro-brasileiros e Euro-brasileiros, concordando com os dados do IBGE (2003), que mostram não existir diferença significativa na prevalência de obesidade e excesso de peso entre esses grupos étnicos na população brasileira. Como já discutido anteriormente, especialmente entre os homens, as maiores prevalências de excesso de peso e obesidade estão relacionadas às maiores faixas de renda e não ao grupo étnico dos indivíduos (IBGE, 2003).

6.2 FENOTIPAGEM DO LOCO *CHE2* E ATIVIDADE DA BChE

A frequência do fenótipo *CHE2* C5+ não foi significativamente diferente em obesos e controles ($5,2\% \pm 1,8\%$ e $10,5\% \pm 2,5\%$, respectivamente; $\chi^2 = 2,89$; $p = 0,08$). A ausência de diferença significativa entre as frequências fenotípicas de obesos e controles provavelmente decorre do número reduzido de indivíduos com fenótipo *CHE2* C5+ identificados nas amostras analisadas. Entretanto, considera-se que não seria necessário um teste bicaudal, uma vez que se espera, com base em dados anteriores, que o fenótipo *CHE2* C5+ esteja negativamente associado a peso (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991) e IMC (ALCÂNTARA et al., 2001). Com base em um teste unicaudal, a diferença observada é significativa ao nível de 5%.

A tabela 6.1 mostra os valores de χ^2 (p) para as comparações entre as frequências do fenótipo *CHE2* C5+ obtidas no presente estudo e aquela obtida para uma amostra da população de Curitiba por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991).

Tabela 6.1. Frequências do fenótipo *CHE2* C5+ (% \pm E.P.) em amostra da população de Curitiba¹ e nas amostras do presente estudo e valores de $\chi^2_{(1)}$ (p) para as comparações entre essas frequências.

População de Curitiba	Amostras	
	Obesos	Controles
10,26% \pm 0,60%	5,2% \pm 1,8%	10,5% \pm 2,5%
$\chi^2_{(1)}$ (p)	5,95 (0,01)*	0,001 (0,96)

¹ CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991. * Diferença significativa.

A frequência do fenótipo *CHE2* C5+ foi significativamente menor no grupo de obesos em relação àquela obtida na referida amostra da população de Curitiba (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991). Embora os trabalhos anteriores apontassem para essa diferença, esse é o primeiro relato de frequência significativamente menor de *CHE2* C5+ entre obesos, sugerindo que esse fenótipo tem efeito protetor em relação à obesidade.

ALCÂNTARA et al. (2003a), analisando amostra de pacientes obesos, encontraram o fenótipo CHE2 C5+ com frequência de $8,84\% \pm 2,24\%$, não diferindo significativamente da população de Curitiba ($\chi^2 = 0,24$; $p = 0,62$). MATTEVI et al. (2002 e 2004) verificaram que a associação entre a variabilidade genética de genes candidatos e fenótipos associados à obesidade diferia entre homens e mulheres. Como a amostra de ALCÂNTARA (2003a) é constituída principalmente por mulheres (90%), enquanto a amostra do presente estudo é exclusivamente masculina, é possível que o loco *CHE2* tenha efeitos distintos para homens e mulheres.

A atividade média da BChE foi significativamente mais alta nos obesos ($6,55 \pm 0,23$) que nos controles ($4,77 \pm 0,13$; $t = 6,69$; $p = 1,56 \times 10^{-10}$), concordando com dados previamente obtidos em nosso laboratório (ALCÂNTARA et al., 2003a). CUCUIANU (1999), revisando diversos dados descritos na literatura, sugere que o aumento da atividade da BChE em obesos está relacionado a diferentes mecanismos que levam à maior síntese ou à menor remoção de triglicérides plasmáticos, ou às conseqüências da hipertrigliceridemia na função hepática. A atividade da BChE é mais alta em pacientes com níveis moderadamente elevados de triglicérides, não sofrendo maior aumento em pacientes com níveis excessivos, de modo que o incremento na atividade da BChE deve estar relacionado ao *turnover* acelerado de ácidos graxos e à maior secreção de VLDL, ao invés de uma sobrecarga do fígado com lípidos.

A ghrelina é um hormônio peptídico de 28 aminoácidos que apresenta um ácido n-octanóico na Ser3 que é essencial para a função endócrina da ghrelina, permitindo sua ligação ao GHS-R e a conseqüente secreção de GH (KOJIMA et al., 2001). Além de estimular a secreção de GH, a ghrelina já foi associada ao aumento de adiposidade, de peso e à hiperfagia (TCHÖRP et al., 2000). Considerando que obesos apresentam níveis séricos mais baixos de ghrelina (TCHÖRP et al., 2001), a maior atividade da BChE verificada em obesos é coerente com os dados de DE VRIESE et al. (2004) que mostram que a BChE é capaz de desoctanoilar a ghrelina, havendo uma correlação entre a atividade da BChE e a desoctonoilação da ghrelina no soro humano. Desse modo, é possível que o aumento da atividade da BChE em obesos esteja relacionado à diminuição dos níveis séricos de ghrelina que constituem parte da resposta fisiológica para compensar o balanço energético positivo associado à obesidade.

ALCÂNTARA et al. (2003a) encontraram atividade média da BChE significativamente maior em obesos que em controles de peso normal somente para indivíduos com fenótipo CHE2 C5–, sugerindo que a associação positiva entre peso e aumento da atividade média da BChE pode depender da variabilidade do gene *CHE2*. No presente estudo a atividade média da BChE mostrou diferenças significativas entre obesos e controles, tanto em indivíduos CHE2 C5+ como em CHE2 C5– ($t = 3,38$; $p < 0,02$ e $t = 6,56$; $p < 10^{-4}$, respectivamente), indicando um aumento da atividade enzimática independente do fenótipo do gene *CHE2*. A atividade da BChE está negativamente correlacionada ao estradiol, sendo mais alta em homens que em mulheres no período fértil e sofrendo um decréscimo durante a gravidez, quando os níveis de estradiol são mais elevados (SHNIDER, 1965; SIDELL e KAMINSKIS, 1975). A amostra analisada por ALCÂNTARA et al. (2003a) era composta principalmente por mulheres, havendo média mais alta do nível de estradiol no grupo de obesos com fenótipo CHE2 C5+ do que nos controles do mesmo fenótipo. Os autores argumentaram que, como o estradiol está negativamente correlacionado com a atividade da BChE, a ausência de diferença significativa na atividade da BChE entre obesos e controles CHE2 C5+ poderia decorrer do alto nível de estradiol apresentado pelos obesos CHE2 C5+. Considerando que a amostra analisada no presente estudo é composta somente por homens, tal efeito não é esperado, havendo diferença significativa na atividade da BChE entre obesos e controles, também para indivíduos com fenótipo CHE2 C5+.

O fenótipo CHE2 C5+ está associado a um aumento significativo da atividade média da BChE, tanto em obesos como em controles (tabela 5.10), de modo que o efeito do alelo *CHE2**C5+ na atividade da BChE também ocorre na obesidade. Dentro do grupo de controles, o aumento da média de atividade da BChE, decorrente do fenótipo CHE2 C5+, foi de $30,5\% \pm 3,7\%$. Entre os obesos, o aumento da média de atividade enzimática de CHE2 C5+ para CHE2 C5– foi de $43,2\% \pm 4,0\%$.

Considerando que o fenótipo CHE2 C5+, que é mais freqüente na população em geral do que nos obesos, está associado a uma atividade da BChE de cerca de 30% a mais, é provável que esteja também associado a uma diminuição dos níveis séricos de ghrelina e, conseqüentemente, a uma tendência para menor peso.

Entre as médias de atividade de obesos e controles CHE2 C5–, o aumento da atividade média da BChE foi de $38,5\% \pm 3,9\%$. Nesse caso, o efeito da obesidade na atividade da BChE ocorre na ausência do alelo *CHE2**C5+. A maior variância da atividade da BChE em obesos CHE2 C5– quando comparados a seus controles CHE2 C5– (7,95 e 2,34, respectivamente; $F = 3,40$; $p < 10^{-4}$; ver figuras 5.9 e 5.10) pode ser devida à heterogeneidade do grupo de obesos em relação a variáveis associadas com a obesidade, como o nível de colesterol e de triglicérides séricos, que estão relacionados ao aumento da atividade da BChE e que não estão disponíveis para análise nesse estudo.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) e ALCÂNTARA et al. (2001) encontraram, respectivamente, médias de peso e de IMC significativamente inferiores em indivíduos CHE2 C5+, quando comparados a seus controles CHE2 C5–. Dentro do grupo de obesos, analisados no presente estudo, não houve diferença significativa entre as médias de peso ou de IMC de indivíduos CHE2 C5+ e CHE2 C5– (tabela 5.12). A ausência de diferença significativa na amostra desse estudo pode decorrer do fato de que todos os indivíduos são obesos ($IMC \geq 30$), de modo que a variação do peso e do IMC é menor do que aquela observada em uma amostra populacional que não tenha sido previamente selecionada através do IMC. Porém, observa-se uma tendência para peso mais alto no pequeno grupo de CHE2 C5+, o que pode indicar que esses indivíduos apresentam fatores de predisposição à obesidade que superam o efeito protetor que o alelo *CHE2**C5+ lhes confere. Seriam indivíduos de alto risco para obesidade.

6.3 GENOTIPAGEM DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE *BCHE*

Os três fragmentos da região regulatória a montante do gene *BCHE* (RR1 = 151 pb, iniciadores PROF1 e PROR1; RR2 = 187 pb, iniciadores PROF2 e PROR2 e RR3 = 176 pb, iniciadores PROF3 e PROR3), analisados através de SSCA, não mostraram variabilidade molecular. Os 12 indivíduos sequenciados para o fragmento RR3 também não apresentaram variação quando comparados com a sequência de referência (JBILO et al., 1994).

A primeira consideração é de caráter técnico e diz respeito à qualidade das

eletroforeses SSCA. Nessas eletroforeses ocorreu ótima separação das bandas de DNA desnaturado (ver figuras 5.12, 5.13 e 5.14), permitindo a visualização das duas fitas de cada segmento amplificado. A realização do segundo tipo de eletroforese SSCA (ver tabelas 4.2 e 5.13) foi uma tentativa, baseada em experiência técnica do nosso laboratório, de otimizar a identificação de variabilidade nos segmentos analisados, pois o aumento da concentração de acrilamida no gel ($T = 11\%$) e a diminuição da bisacrilamida na solução estoque de acrilamida ($C = 2\%$) mostraram-se eficientes para a identificação de variabilidade em outros segmentos analisados. Mudanças na concentração de glicerol e na temperatura da corrida eletroforética também podem otimizar a detecção de variantes, permanecendo essa possibilidade para estudos posteriores. De acordo com HAYASHI e YANDELL (1993), com o uso de PCR-SSCA há uma probabilidade de cerca de 90% de detecção de mutação em um segmento de cerca de 237 pb. Desse modo, a não detecção de variação pode ser devida aos 10% de possibilidade de falha na metodologia utilizada.

A segunda consideração diz respeito à possibilidade de não ocorrerem, ou de ocorrerem com extrema raridade, variações nesses três fragmentos da região regulatória a montante do gene *BCHE*. O fragmento RR1 contém um sítio de ligação para PEA3, RR2 contém dois sítios de ligação para Oct-1 e RR3 contém um sítio de ligação para AP1, além do sítio de início de transcrição. JBILO et al. (1994) sugeriram que a ativação do elemento de iniciação do gene *BCHE* pode ocorrer através de um fator AP1, pois o plasmídeo pCB58wI, que não continha o sítio AP1, não apresentava atividade de promotor. De acordo com WASYLYK et al. (1990), os motivos PEA3 (ativados por Ets) e AP1 podem funcionar sinergisticamente para a ativação da transcrição. O sítio de ligação de Oct-1, identificado no gene *BCHE* humano (JBILO et al. 1994) pode ser reconhecido por vários membros da família POU de fatores de transcrição, incluindo Oct-3 e Oct-4, que estão presentes em células embrionárias totipotentes e pluripotentes de camundongos e são negativamente regulados com o avanço da diferenciação celular, sugerindo que tenham um papel no início do desenvolvimento (SCHOLER et al., 1989, ROSNER et al., 1990). Considerando todas essas colocações, é possível que variações nessas regiões levem a alterações extremas na expressão da BChE, justificando assim sua raridade.

6.4 GENOTIPAGEM DOS EXONS DO LOCO *BCHE*

A análise do fragmento de 203 pb (nt -268 ao nt 27 da ext. 5' do intron 1; iniciadores E1F e E1R), que inclui o exon 1 do gene *BCHE*, permitiu a identificação de um polimorfismo G→A na posição nt -116. O seqüenciamento dos segmentos de DNA que contêm o sítio da mutação -116G→A, em 12 indivíduos previamente genotipados por PCR-SSCA, confirmou, em todos os casos, os resultados obtidos, aumentando, assim, a confiabilidade técnica desses resultados (tabela 5.14 e figuras 5.20 e 5.21). Esse estudo é o primeiro relato, em população brasileira, desse polimorfismo, que foi originalmente identificado por BARTELS et al. (1990). Não foram verificadas diferenças significativas entre obesos e controles quanto às frequências do alelo -116A (tabela 5.15) ou dos respectivos genótipos (tabela 5.16). As frequências do alelo -116A para obesos ($\chi^2_{(1)} = 0,01$; $p = 0,91$), controles ($\chi^2_{(1)} = 0,01$; $p = 0,91$) e obesos e controles reunidos ($\chi^2_{(1)} = 0,01$; $p = 0,91$) não apresentam diferenças significativas em relação à frequência de 8,0%, descrita por BARTELS et al. (1990).

BARTELS et al. (1990) observaram que os heterozigotos -116G/-116A eram todos heterozigotos ou homozigotos para a mutação A539T, constatando desequilíbrio de ligação entre os alelos -116A do exon 1 e A539T do exon 4. Na amostra total analisada nesse estudo (obesos + controles) também foi detectado desequilíbrio de ligação ($D' = 91,2\%$), havendo acoplamento entre as variantes -116A e A539T (tabelas 5.19 e 5.20).

O alelo D70G, do exon 2, foi encontrado com frequências semelhantes nos obesos e controles (tabelas 5.15 e 5.16), concordando com resultados anteriores obtidos em nosso laboratório referentes a peso e IMC (FADEL-PICHETH, 1991 e SOUZA, 2005). A frequência total (obesos + controles, $1,06\% \pm 0,43\%$) do alelo D70G é semelhante àquela encontrada por MYKAMI (2005) para amostra da população de Curitiba ($1,80\%$; $\chi^2_{(1)} = 0,67$; $p = 0,41$). As comparações das frequências do alelo D70G para obesos e controles, analisados separadamente, com aquela obtida por MYKAMI (2005) também não mostraram diferenças significativas ($1,42 \pm 0,70\%$; $\chi^2_{(1)} = 0,01$, $p = 0,92$ e $0,71 \pm 0,50\%$; $\chi^2_{(1)} = 0,95$, $p = 0,33$, respectivamente).

O segundo fragmento do exon 2 analisado nesse estudo contém o sítio da mutação *T243M*, que foi encontrada com frequências semelhantes em obesos e controles (tabelas 5.15 e 5.16). MYKAMI (2005) obteve a frequência de 0,28% para o alelo *T243M* em amostra da população de Curitiba, semelhante às frequências obtidas no presente estudo para obesos e controles analisados separadamente ou reunidos ($\chi^2_{(1)} = 0,01$, $p = 0,92$; $\chi^2_{(1)} = 0,01$, $p = 0,92$ e $\chi^2_{(1)} = 0,05$, $p = 0,83$, respectivamente).

O alelo *G390V* foi identificado, com frequências semelhantes em obesos e controles (tabelas 5.15 e 5.16). As frequências obtidas para o alelo *G390V* são semelhantes àquela descrita por MYKAMI (2005) para a população de Curitiba (0,28%; obesos: $\chi^2_{(1)} = 2,76$, $p = 0,10$; controles: $\chi^2_{(1)} = 1,17$, $p = 0,30$ e obesos + controles: $\chi^2_{(1)} = 2,95$, $p = 0,09$).

Obesos e controles apresentam frequências semelhantes para o alelo *A539T* (tabelas 5.15 e 5.16). Essas frequências são semelhante àquela encontrada por SOUZA et al. (1998), em amostra da população de Curitiba (18,4%; obesos: $\chi^2_{(1)} = 0,41$, $p = 0,52$; controles: $\chi^2_{(1)} = 0,39$, $p = 0,54$ e obesos + controles: $\chi^2_{(1)} = 0,78$, $p = 0,38$).

Considerando que obesos e controles não exibem diferenças significativas nas frequências alélicas ou genotípicas relativas às mutações identificadas nos exons do gene *BCHE*, parece não existir uma relação causal direta entre as mutações identificadas e a predisposição para a obesidade. Porém, a obesidade é uma característica multifatorial associada a vários genes de pequeno efeito. Desse modo, o tamanho relativamente pequeno das amostras de obesos (N=153) e controles (N=153), pode não ter permitido a detecção de diferenças discretas de frequência, principalmente no que se refere aos alelos de frequência mais baixa como *D70G*, *T243M* e *G390V*.

Embora não tenham sido detectadas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre obesos e controles, como mostram as análises discutidas no próximo item, o uso de análises estatísticas quantitativas pode ser mais eficiente na detecção de pequenos efeitos de genes envolvidos em características multifatoriais como a obesidade.

6.5 ANÁLISES RELATIVAS ÀS MUTAÇÕES *-116A* E *A539T* DO EXON 4

A presença da mutação *-116A* está associada a um aumento da média de IMC nos obesos (tabela 5.21), sendo o presente estudo o primeiro relato dessa associação. O grupo de controles é constituído somente por indivíduos de categoria de peso normal ($20 \leq \text{IMC} < 25$), de modo que as análises relativas ao IMC se tornam comprometidas. Desse modo, é possível que o aumento de IMC não seja restrito a obesos, sendo necessária uma análise dessa associação em uma amostra populacional, coletada ao acaso quanto ao IMC, para elucidar essa questão.

A maioria dos portadores da mutação *-116A* é também heterozigota para a mutação *A539T* (tabelas 5.22 e 5.25), desse modo, foram realizadas comparações levando em conta os genótipos referentes às duas mutações (tabelas 5.23 e 5.26). A menor variância de IMC, verificada em obesos *U/A539T*, provavelmente é um efeito da mutação *A539T* quando não ocorre em heterozigotos *-116G/-116A*, pois é observada apenas em homozigotos *-116G/-116G*. O aumento da média de IMC parece depender da presença do alelo *-116A*, pois não aparece em homozigotos *-116G/-116G*. Porém, como a maioria dos portadores do alelo *-116A* é também heterozigota *U/A539T*, não é possível descartar a hipótese de que esse seja um efeito combinado das duas mutações.

De acordo com RUBINSTEIN et al. (1978), há uma redução de 33% no número de moléculas circulantes da BChE em decorrência da mutação K, que mais tarde foi identificada, ao nível do DNA, como a mutação *A539T*, à qual se atribui essa redução na atividade da BChE de seus portadores. ALTAMIRANO et al. (2000) verificaram que a mutação *A539T* parece não ter nenhum efeito na estrutura ou atividade da BChE, pois a enzima com essa mutação não apresentou diferenças com a BChE usual em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou formação sérica de tetrâmeros. Os autores sugerem que o decréscimo no número de moléculas circulantes da BChE, associado ao fenótipo variante K, pode ser causado por mutações na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*. No presente estudo, foi verificada menor atividade da BChE nos indivíduos portadores da mutação *A539T* (tabelas 5.28, 5.29, 5.30, 5.33, 5.34 e 5.35), porém, como mostra a análise que também leva em conta o genótipo na posição do nt-116, essa diminuição parece depender da mutação *-116A* e não da mutação *A539T*, pois só é verificada nos portadores do alelo *-116A* e

não nos heterozigotos *U/A539T* que são homozigotos *-116G/-116G*. Apesar dessa mutação não ocorrer na região codificadora do peptídio maduro, pertence a uma região transcrita do gene *BCHE*, podendo estar envolvida na regulação da expressão da BChE.

Como já foi discutido anteriormente (item 6.2), é coerente que indivíduos obesos tenham maior atividade da BChE, de modo a diminuir os níveis séricos de ghrelina, uma adaptação fisiológica ao balanço energético positivo relacionado à obesidade. Como a mutação *-116A* está associada a uma diminuição da atividade da BChE, é possível considerar que os portadores dessa mutação tem média de IMC maior justamente pela atividade reduzida da BChE. A menor atividade da BChE poderia diminuir a desoctonoilação da ghrelina, aumentando seus níveis plasmáticos e, conseqüentemente, levando à hiperfagia, à diminuição do uso de gorduras e ao aumento de peso.

SOUZA et al. (2005) verificaram que os genótipos referentes à mutação *A539T* não estavam homogeneamente distribuídos em uma amostra da população de Curitiba classificada em dois grupos quanto ao IMC: extremo ($\text{IMC} \geq 30$ e $\text{IMC} < 20$) e não extremo, verificando uma frequência mais alta do genótipo *U/A539T* no grupo com IMC extremo. No presente estudo, os genótipos referentes à mutação *A539T* estão homogeneamente distribuídos entre obesos e controles (tabela 5.16) e também entre obesos leves, graves e mórbidos (tabela 5.27). A diferença entre os resultados obtidos anteriormente e no presente estudo, provavelmente decorre da presença de indivíduos com $\text{IMC} < 20$ no grupo extremo de SOUZA et al. (2005). No grupo de $\text{IMC} < 20$ (SOUZA et al., 2005 – dados não mostrados) a distribuição dos genótipos referentes à mutação *A539T* difere do restante da amostra analisada. Entretanto, comparação semelhante realizada com o grupo de $\text{IMC} \geq 30$, não mostrou diferença significativa entre esse grupo e o restante da amostra. Com essa interpretação, há uma compatibilidade entre os resultados de SOUZA et al. (2005) e os do presente estudo.

LEPIENSKI (2004) analisou pacientes diabéticos do tipo II, classificados como *U/U* e *U/A539T + A539T/A539T* e verificou variâncias de IMC significativamente maiores no grupo *U/U* de diabéticos do tipo II. Embora o grupo de diabéticos não seja constituído exclusivamente por indivíduos obesos, a sua média de IMC é maior que 30 ($30,13 \pm 0,58$). Nos obesos do presente estudo, os genótipos referentes à mutação

A539T, mostraram diferenças significativas quanto às variáveis antropométricas peso, altura e IMC (tabelas 5.28, 5.29 e 30). O grupo de obesos *U/U* tem variância significativamente maior para as três variáveis antropométricas quando comparado aos grupos *U/A539T* e *U/A539T + A539T/A539T*, concordando com os resultados obtidos por LEPIENSKI (2004) e reforçando a evidência de associação entre o alelo *A539T* e o IMC.

SOUZA et al. (2005a), no mesmo trabalho anteriormente referido, verificaram variância de IMC significativamente maior no grupo *U/A539T* em relação ao grupo *U/U*. Embora os dados de SOUZA et al. (2005a) sejam opostos aos obtidos no presente estudo, o grupo com IMC extremo do trabalho de SOUZA et al. (2005) apresentou frequência mais alta do genótipo *U/A539T*, de modo que esta pode ser a causa da maior variância de IMC detectada entre os indivíduos com genótipo *U/A539T*, principalmente devida ao indivíduos com $IMC < 20$. No presente estudo, a menor variância de IMC para os indivíduos com genótipo *U/A539T* é verificada dentro do grupo de obesos, não sendo possíveis comparações relativas ao IMC entre obesos e controles ou dentro do grupo de controles, pois os dois grupos foram inicialmente selecionados pelo IMC, sendo o grupo controle constituído somente por indivíduos com IMC entre 20 e 25 ($20 \leq IMC < 25$).

Não foram verificadas diferenças significativas relativas às variâncias do IMC entre obesos *U/U* e *A539T/A539T*. Esse resultado parece sugerir que a diferença detectada entre as variâncias de obesos *U/U* e *U/A539T* é decorrente do genótipo *U/A539T* e não do alelo *A539T*, concordando com a hipótese de SOUZA et al. (2005a). Porém, é importante salientar que o número de obesos *A539T/A539T* é pequeno ($N = 06$) e que também não foram encontradas diferenças significativas entre as variâncias de obesos *U/A539T* e *A539T/A539T*.

A análise dos quartis de IMC de obesos, classificados em *U/U*, *U/A539T* e *U/A539T + A539T/A539T*, mostrou que no quartil superior existe diferença significativa nas variâncias de IMC entre os grupos *U/U* e *U/A539T* e entre *U/U* e *U/A539T + A539T/A539T* e que no quartil inferior apenas *U/U* e *U/A539T + A539T/A539T* exibem variâncias diferentes (tabelas 5.31 e 5.32). A ausência de diferenças significativas entre as variâncias do IMC nos dois quartis intermediários sugere que a menor variância observada em obesos *U/A539T* e *U/A539T +*

A539T/A539T seja devida aos dois grupos extremos de obesos, especialmente ao grupo constituinte do quartil superior. A separação dos obesos *U/U*, *U/A539T* e *U/A539T + A539T/A539T* em quartis, também mostrou que no quartil superior, a média de IMC em *U/A539T* e *U/A539T + A539T/A539T* é significativamente menor que em *U/U*. A análise das tabelas 5.31 e 5.32 mostra que o quartil superior de IMC inclui todos os indivíduos com obesidade grave e mórbida ($IMC \geq 35$) e que todos os obesos mórbidos têm genótipo *U/U*. A análise dos obesos constituintes do quartil superior de IMC, quanto aos genótipos referentes à mutação *-116A*, mostra que todos os indivíduos *U/U* são homozigotos *116G/-116G* e que entre os *U/A539T + A539T/A539T* existem cinco indivíduos heterozigotos *-116G/-116A* (tabela 5.33). Esses resultados sugerem um efeito protetor do alelo *A539T* em relação ao agravamento da obesidade, capaz de compensar o efeito contrário da mutação *-116A*.

A busca de associação entre BChE e obesidade pode ser realizada através de, pelo menos, duas formas distintas de amostragem. Na primeira delas, as variantes genéticas da BChE são o ponto de partida para a seleção das amostras a serem estudadas, que devem oferecer um número adequado de cada fenótipo ou genótipo, de modo a permitir a detecção de associação. A partir desse tipo de abordagem foram verificadas, por exemplo, associações entre os fenótipos do gene *CHE2* e peso (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991) e IMC (ALCÂNTARA et al, 2001), bem como entre variantes do gene *BCHE*, peso, altura e IMC (SOUZA et al. 2005a). A segunda forma de amostragem é aquela utilizada no presente estudo, ou seja, selecionar uma amostra a partir da variável de interesse ($IMC \geq 30$) e buscar associações com a variabilidade genética da BChE. Essa abordagem não tem, em geral, poder de detectar associação com variantes genéticas raras, como é o caso de algumas das estudadas no presente estudo. Embora as frequências das variantes genéticas do gene *BCHE* não sejam diferentes em obesos e controles, os resultados do presente estudo confirmam, de modo geral, a existência de associação entre a variabilidade genética da BChE, peso e IMC, reforçando a hipótese de um papel da BChE em processos metabólicos associados à obesidade.

7 CONCLUSÕES

7.1 AMOSTRA DE DOADORES DE SANGUE

7.1.1 Os doadores de sangue são caracterizados por frequências significativamente menores de déficit de peso, excesso de peso e obesidade do que a população curitibana e brasileira.

7.1.2 A obesidade tem frequências semelhantes entre homens e mulheres, mas o excesso de peso é mais freqüente entre os homens. Homens e mulheres doadores de sangue, separadamente, também apresentam frequências menores de obesos do que a população de Curitiba.

7.1.3 Entre os doadores de sangue, o aumento da idade leva a um aumento nas proporções das categorias de excesso de peso e obesidade e à conseqüente diminuição de peso normal. Idade e IMC estão positivamente correlacionados na amostra de doadores de sangue, apresentando a mesma tendência observada na população brasileira.

7.1.4 Na amostra de doadores de sangue, assim como na população brasileira, não há diferença significativa na proporção de obesidade e excesso de peso entre Afro-brasileiros e Euro-brasileiros.

7.2 FENOTIPAGEM DO LOCO *CHE2* E ATIVIDADE DA BChE

7.2.1 Considerando as evidências prévias de correlação negativa entre o fenótipo *CHE2* C5+ e IMC, o fenótipo *CHE2* C5+ é menos freqüente no grupo de obesos que em seus controles de peso normal.

7.2.2 O fenótipo *CHE2* C5+ é menos freqüente no grupo de obesos que em amostra da população de Curitiba, sugerindo que esse fenótipo tem efeito protetor em relação à obesidade.

7.2.3 A atividade média da BChE é mais alta nos obesos que nos controles, concordando com dados previamente obtidos em nosso laboratório.

7.2.4 O fenótipo CHE2 C5+ está associado a um aumento da atividade média da BChE, tanto em obesos como em controles.

7.2.5 Não há diferença significativa entre as médias de peso ou de IMC de obesos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

7.3 GENOTIPAGEM DA REGIÃO REGULATÓRIA A MONTANTE DO GENE *BCHE*

7.3.1 A região regulatória a montante do gene *BCHE* não apresentou variação detectável através da metodologia utilizada nesse estudo, sugerindo que, se houverem variações, estas devem ser raras.

7.4 GENOTIPAGEM DOS EXONS DO GENE *BCHE*

7.4.1 Todas as mutações identificadas nos exons do gene *BCHE* têm frequências alélicas e genotípicas semelhantes em obesos e controles.

7.4.2 Em obesos e controles, as frequências alélicas e genotípicas, relativas às mutações identificadas nos exons do gene *BCHE*, são semelhantes aos dados disponíveis na literatura.

7.5 ANÁLISES RELATIVAS ÀS MUTAÇÕES -116A DO EXON 1 E A539T DO EXON 4

7.5.1 O genótipo -116G/-116A está associado a um aumento da média de IMC nos obesos.

7.5.2 O genótipo -116G/-116A está associado a uma diminuição na atividade média da BChE em obesos e controles.

7.5.1 Os genótipos referentes à mutação A539T estão homogeneamente distribuídos entre obesos e controles e entre obesos leves, graves e mórbidos.

7.5.2 As variâncias de peso, altura e IMC são maiores em obesos *U/U* que em obesos *U/A539T* e *U/A539T + A539T/A539T*, concordando com resultados obtidos anteriormente e reforçando a evidência de associação entre o alelo A539T e o IMC.

7.5.3 A menor variância observada em obesos $U/A539T$ e $U/A539T + A539T/A539T$ é devida, principalmente, ao grupo constituinte do quartil superior de IMC.

7.5.4 A média de IMC em obesos $U/A539T$ e $U/A539T + A539T/A539T$, do quartil superior de IMC, é menor que em U/U , sugerindo um efeito protetor do alelo $A539T$, especialmente do genótipo $U/A539T$, em relação ao agravamento da obesidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMA, A.S. e FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, p. 327-332, 2000.
- AKIZUKI, S.; OHNISHI, A.; KOTANI, K. e SUDO, K. Genetic and immunological analyses of patients with increased serum butyrylcholinesterase activity and its C5 variant form. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 42, p. 991-996, 2004.
- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, G.; VIEIRA, M.M. A method for serum cholinesterase phenotyping. **Rev. Bras. Genet.**, v. 14, p. 841-846, 1991.
- ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.**, v. 73, p. 587-595, 2001.
- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SCARTEZINI, M.; CERCI, M.S.; BRAUN-PRADO, K. e PICHETH, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 62, p. 399-404, 2002.
- ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPPLY, H.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the *CHE2* C5+ and *CHE2* C5- phenotypes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.27, p. 1557-1564, 2003a.
- ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. The variable expression of the C_{4/5} complex of human Butyrylcholinesterase and body mass index. **Hum. Biol.**, v.75, p. 47-55, 2003b.
- ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPPLY, H.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 43, p. 285-288, 2005.

- ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 869-877, 2000.
- ANDERSEN, B. e ROSENFELD, M.G. POU domain factors in the neuroendocrine system: Lessons from developmental biology provide insights into human disease. **Endocrine Reviews**, v 22, p. 2–35, 2001.
- ANGEL, P. e KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1072, p.129-157, 1991.
- ANTOPOL, W.; TUCHMAN, L. e SCHIFRIN, A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 36, p. 6-50, 1937.
- APPLEYARD, M.E. Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. **Trends Neurosci.**, v. 15, p. 485-490, 1992.
- APPLEYARD, M. e JAHNSEN, H. Action of acetylcholinesterase in the guinea pig cerebellar cortex in vitro. **Neuroscience**. v. 47, p. 291-301, 1992.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. e LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry.**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: **Handbook of experimental pharmacology**. Koelle, G.B. (org). Springer-Verlag, Berlin e Nova York, p. 89-128, 1963.
- BALASUBRAMANIAN, A.S. Have cholinesterases more than one function? **Trends Neurosci.**, v. 7, p. 467-468, 1984.
- BALASUBRAMANIAN, A.S. e BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, v. 7, p. 1354-58, 1993.

- BARRY, W.T.C.; COWIN, P.J. e DAVIS, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudocholinesterase. **Brit. J. Nutr.**, v. 8, p. 79-82, 1954.
- BARTELS, C.F.; VAN DER SPEK, A.F.L. e LA DU, B.N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.
- BARTELS, C.F.; JAMES, K. e LA DU, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1104-14, 1992a.
- BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1086-103, 1992b.
- BAUMGARTER, R.N.; HEYMSFIELD, S.B. e ROCHE, A.F. Human body composition and the epidemiology of chronic disease. **Obes. Res.** v. 3, p. 73-95, 1995.
- BEAUMONT, J.L.; CARLSON, L.A.; COOPER, G.R.; FEJFAR, Z.; FREDRICKSON, D.S. e STRASSER, T. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, v. 43, p. 891-915, 1970.
- BHANUMATHY, C.D. e BALASUBRAMANIAN, A.S. Selective inactivation of butyrylcholinesterase with metal chelators suggest there is more than one metal binding site. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 695-705, 1998.
- BHANUMATHY C.D.; RAO, R.V. e BALASUBRAMANIAN, A.S. Serum butyrylcholinesterase of non-human primate shows amine sensitive aryl acyl amidase and metallopeptidase activities and characteristics similar to those of the human serum enzyme. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 35, p. 148-156, 1998.
- BOECK, A.T.; FRY, D.L.; SASTRE, A. e LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, p. 154-156, 2002.
- BOOPATHY, R. e BALASUBRAMANIAN A.S. Peptidase activity exhibited by human serum pseudocholinesterase. **Eur. J. Biochem.**, v. 162, p. 191-197, 1987.

- BOOPATHY, R. e LAYER, P.G. Aryl acylamidase activity on acetylcholinesterase is high during early chicken brain development. **Protein J.**, v. 23, p. 325-333, 2004.
- BYTYQI, A.H.; LOCKRIDGE, O.; DUYSSEN, E.; WANG, Y.; WOLFRUM, U. e LAYER, P.G. Impaired formation of the inner retina in an AChE knockout mouse results in degeneration of all photoreceptors. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, p. 2953-2962, 2004.
- CALLE, E.E.; THUN, M.J.; PETRELLI, J.M.; RODRIGUEZ, C.; HEATH, C.W. JR. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. **Engl. J. Med.**, v. 341, p.1097-1105, 1999.
- CAVIGELLI, M.; DOLFI, F.; CLARET, F.X. e KARIN M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. **EMBO J.**, v. 14, p. 5957-5964, 1995.
- CHATTONET, A. e LOCKRIDGE, O. Comparision of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.**, v. 260, p. 625-34, 1989.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C. e VIEIRA, M.M. The C₅ isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 330-339, 1991.
- CHECLER, F.; GRASSI, J. e VINCENT, J-P. Cholinesterases display genuine arylacylamidase activity but are totally devoid of intrinsic peptidase activities. **J. Neurochem.**, v. 62, p. 756-763, 1994.
- CHU, M.I.; FONTAINE, P.; KUTTY, K.M.; MURPHY, D. e REDHEENDRAN, R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. **Clin. Chim. Acta**, v. 85, p. 55-59, 1978.
- CLITHEROW, J.W.; MITCHARD, M. e HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. **Nature**, v. 199, p. 1000-1001, 1963.
- CRISTOL, P.; PASSOUANT, P.; BENEZCH, C. e DUTARTE, J. Valeur séméiologique de la cholinestérase sérique. **Pr. méd.**, v. 40, p. 557, 1946.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A. e HARAGUS, ST. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. **Clin. Chim. Acta**, v. 22, p. 151-155, 1968.

- CUCUIANU, M.; OPINCARU, A. e TAPALAGĂ, D. Similar behavior of lecithin: cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia. **Clin. Chim. Acta**, v. 85, p. 73-79, 1978.
- CUCUIANU, M. Serum gamma-glutamyltransferase and/or serum cholinesterase as markers of the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1381-1382, 1999.
- DESHMUKH, M.B. Changes in serum cholinesterase activity and lipoprotein cholesterol levels in rats during diabetes. **IRCS Med. Sci.**, v. 14, p. 234, 1986.
- DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WAELBROECK, M.; ROBBERECHT, P. E DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**, v. 145, p. 4997-5005, 2004.
- DEY, D.C.; KANNO, T.; SUDO, K. e MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity—three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61 (suppl), p. 2307, 1997.
- DEY, D.C.; MAEKAWA, M.; SUDO, K. e KANNO, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. **Ann. Clin. Biochem.** (Part 2), v. 35, p. 302–310, 1998.
- DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e HODGES, L.K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Genet.**, v. 24, p.58-64, 1972.
- DUBBS, C.A. Ultrasonic effects on isoenzymes. **Clin Chem.**, v. 12, p. 181-186, 1966.
- EGGER, M.S.; SHNEIDER, M.; DAVEY-SMITH, G. Spurious precision? Meta-analysis of observational studies. **Br. Med. J.**, v. 316, p. 140-144, 1998.
- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. **Clin. Genet.**, v. 35, p. 313-321, 1989.

- ELIA, M. Obesity in the elderly. **Obes. Res.**, v. 9, p. 244–248, 2001.
- FABER, M. Serum cholinesterase in diseases. **Acta. Med. Scand.**, v. 114, p. 59-71, 1943.
- EMMET, S.R. e GREENFIELD, S.A. A peptide derived from the C-terminal region of acetylcholinesterase modulates extracellular concentrations of acetylcholinesterase in the rat substantia nigra. **Neurosci. Lett.**, v. 358, p. 210-214, 2004.
- EVANS, R.T. e WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.
- FADEL-PICHETH, C. **Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba.** Curitiba, 1991. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- FALCONER, D.S. The Inheritance of liability to certain diseases estimated from the incidence among relatives. **Ann. Hum. Genet.**, v. 29, p.51-76, 1965.
- FREDRICKSON, D.S.; LEVY, R.I. e LEES, R.S. Fat transport in lipoproteins - an integral approach to mechanisms and disorders. **N. Engl. J. Med.**, v. 276, p. 34-44, 94-103, 148-156, 215-225, 273-281, 1967.
- FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B. e CLEMENT, K. Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome. **Presse Med.**, v. 29, p. 564-571, 2000.
- FROGUEL, P. e BOUTIN, P. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 226, n. 11, p. 991-996, 2001.
- GAFFNEY, D. e CAMPBELL, R.A. A PCR method to determine the Kallow allele frequency and its significance in the normal population. **J. Med. Genet.**, v. 31, p. 248-50, 1994.
- GALLAGHER, D.; VISSER, M.; SEPULVEDA, D.; PIERSON, R.N.; HARRIS, T. e HEYMSFIELD, S.B. How useful is bodymass index for comparison of body fatness

- across age, sex, and ethnic groups? **Am. J. Epidemiol.**, v. 143, p. 228-39, 1996.
- GALLANGO, M.L. e ARENDS, T. Phenotypical variants of pseudocholinesterase in myeloma patients. **Human. Genet.**, v. 7, p. 104-108, 1969.
- GARCIA-AYLLON, M.S.; SAEZ-VALERO, J.; MUNOZ-DELGADO, E. e VIDAL, C.J. Identification of hybrid cholinesterase forms consisting of acetyl- and butyrylcholinesterase subunits in human glioma. **Neuroscience**, v. 107, p. 199-208, 2001.
- GARRY, P.J.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K. e RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, v. 13, p. 38-42, 1976.
- GÄTKE, M.R.; ØSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F. e VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiology**, v. 95, p. 600-606, 2001.
- GEORGE, S.T. e BALASUBRAMANIAN, A. The identity of the serotonin-sensitive aryl acylamidase with acetylcholinesterase from human erythrocytes, sheep basal ganglia and electric eel. **Eur. J. Biochem.**, v. 111, p. 511-524, 1980.
- GEORGE, S.T. e BALASUBRAMANIAN, A. The aryl acylamidase and their relationship to cholinesterase in human serum, erythrocyte and liver. **Eur. J. Biochem.**, v. 121, p. 177-186, 1981.
- GEORGE, K.M.; MONTGOMERY, M.A.; SANDOVAL, L.E. e THOMPSON, C.M. Examination of cross-antigenicity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using anti-acetylcholinesterase antibodies. **Toxicol. Lett.**, v. 126, p. 99-105, 2001.
- GNATT, A.; PRODY, C.A.; ZAMIR, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. **Cancer Res.** v. 50, p. 1983-1987, 1990.
- GOEDDE, H.W.; GEHRING, D. e HOFMAN, R.A. On the problem of a silent gene in

- pseudocholinesterase polymorphism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 107, p. 391-93, 1965.
- GREENBERG, C.P.; PRIMO-PARMO, S.L.; PANTUCK, E.J. e LA DU, B.N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. **Anesth. Analg.**, v. 81, p. 419-421, 1995.
- GREENFIELD, S. A. Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. **Trends Neurosci.**, v. 7, p. 364-368, 1984.
- GREENFIELD, S.A. A non-cholinergic action of acetylcholinesterase in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 11, p. 55-77, 1991.
- GRIFMAN, M.; GALYAM, N.; SEIDMAN, S. e SOREQ, H. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 13935–13940, 1998.
- HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y. e HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cyrrhosis. **Intern. Med.**, v. 31, p. 357-62, 1992.
- HALAAS, J.L.; GAJIWALA, K.S.; MAFFEI, M.; COHEN, S.L.; CHAIT, B.T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R.L.; BURLEY, S.K. e FRIEDMAN, J.M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 269, p. 543-546, 1995.
- HALL, L.M.C. e SPIERER, P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader . **EMBO J.**, v. 5, 2949-54, 1986.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for WINDOWS 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95- 98, 1999.
- HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. 3^a ed. Amsterdam:

Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980, p. 171.

HARRIS, H.; WHITTAKER, M.; LEHMAN, H. e SILK, E. The pseudocholinesterase variants. Esterase levels and dibucaine numbers in families selected through suxamethonium-sensitive individuals. **Acta. Genet. Stat. Med.**, v. 10, p. 1-6, 1960.

HARRIS, H. e WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. **Nature**, v. 191, p. 496-8, 1961.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A e ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-98, 1962.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; GLEN-BOTT, A.M. e THORNTON, J.A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-87, 1963a.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; HOPKINSON, D.A. e WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. **Ann. Hum. Genet.**, v. 26, p. 359-82, 1963b.

HART, S.M. e MITCHELL, J.V. Suxamethonium in the absence of pseudocholinesterase. **Br. J. Anaesthesiology**, v. 34, p. 207-209, 1962.

HAYASHI, K; YANDELL, D.W. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum. Mutat.**, v. 2, p. 338-346, 1993 .

HEITMANN, B.L.; ERIKSON, H.; ELLSINGER, B.M.; MIKKELSEN, K.L.; LARSSON, B. Mortality associated with body fat, fat-free mass and body mass index among 60-year-old swedish men-a 22-year follow-up. The study of men born in 1913. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24, p. 33-37, 2000.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L. e LA DU, B.N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Rinsho Byori**, v. 40, p. 535-40, 1992.

- HIDAKA, K.; IUCHI, I.; TOMITA, M.; WATANABE, Y.; MINATOGAWA, Y.; IWASAKI, K.; GOTOH, K. e SHIMIZU, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Ann. Hum. Genet.**, v. 61, p. 491–496, 1997.
- HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y. e IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping, **Clin. Chim. Acta**, v. 303, p. 61–67, 2001.
- HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F.; SCHAFER, H.; SIEGFRIED, W.; GOLDSCHMIDT, H.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 87, p. 2716-2719, 2002.
- HOFFMAN, R.S.; MORASCO, R. e GOLDFRANK, L.R. Administration of purified human plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 34, p. 259–266, 1996.
- HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MATSUO, H. e KANGAWA, K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 279, p. 909-913, 2000.
- HSIANG, Y.H.; WU, H.Y. e LIU, L.F. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. **Cancer Res.**, v. 48, p. 3230-3235, 1988.
- HUTCHINSON, A.O.; MCCANCE, R.A. e WIDDOWSON, E.M. Serum cholinesterases. In: Studies of undernutrition, Wuppertal, 1946-1949. **Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun.** (Lond.), v. 275, p. 216-225, 1951.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares-2002-2003**, 2003.
- IZUMI, M.; MAEKAWA, M. e KANNO, T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: Frequency of allele and associated enzyme activity in serum. **Clin. Chem.**, v. 40, p. 1606-7, 1994.

- JAGANATHAN, L. e BOOPATHY, R. A direct method to visualize the aryl acylamidase activity on cholinesterases in polyacrylamide gels. **BMC Biochemistry**, v. 1, p. 3, 2000.
- JAYANTHI, L. D.; BALASUBRAMANIAN, N.; e BALASUBRAMANIAN, A.S. Cholinesterases exhibiting aryl acylamidase activity in human amniotic fluid. **Clin. Chim. Acta**, v. 205, p. 157-166, 1992.
- JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F. e LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, v. 2, p. 234-240, 1992.
- JENSEN, F.S.; NIELSEN, L.R. e SCHWARTZ, M. Detection of plasma cholinesterase K-variant by PCR using an amplification created restriction site. **Hum. Hered.**, v. 46, p. 26-31, 1996.
- JBILLO, O.; TOUTANT, J.P.; VATSIS, K.P.; CHATONNET, A. e LOCKRIDGE, O. Promoter and Transcription Start Site of Human and Rabbit Butyrylcholinesterase Genes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 33, p. 20829-20837, 1994.
- JOHNSON, G. e MOORE, S.W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 18, p. 781–790, 2000.
- KÁLMÁN, J.; JUHÁSA, A.; RAKONCZAYB, Z.; ÁBRAHÁM, G.; ZANAA, M.; BODAD K.; FARKASE, T.; PENKEF, B. e JANKA, Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.**, v. 75, p. 1195–1204, 2004.
- KALOW, W. e GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 339-346, 1957.
- KALOW, W. e STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 1305-20, 1957.
- KOCH, G.A.; SCHOEN, R.C.; KLEBE, R.J. e SHOWS, T.B. Assignment of a fibronectin

- gene to human chromosome 2 using monoclonal antibodies. **Exp. Cell. Res.**, v. 141, p. 293-302, 1982.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H. e KANGAWA, K. Ghrelin: Discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 12, p. 118-122, 2001.
- KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, 2000.
- KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D.C.; MEIN, C.A.; WEILL, J.; GROSSMAN, A.B. e FROGUEL, P.A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 87, p. 4005-4008, 2002.
- KRAPP, A. e STRUBIN, N. B-Cell Coactivator OBF-1 Exhibits Unusual Transcriptional Properties and Functions in a DNA-Bound Oct-1-Dependent Fashion. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 4247-4254, 1999.
- KUTTY, K.M. e ACHARYA, C.D. Serum cholinesterase and lipoproteins: a possible relationship. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, (supl. 126), v. 29, Resumo 3.28, 1972.
- KUTTY, K.M.; ROWDEN, G. e COX, A.R. Interrelationship between serum b-lipoprotein and cholinesterase. **Canad. J. Biochem.**, v. 51, p. 883-887, 1973.
- KUTTY, K.M.; JACOB, J.C.; HUTTON, C.J.; DAVIS, P.J. e PETERSON, S.C. Serum beta-lipoproteins: studies in a patient and in guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. **Clin. Biochem.**, v. 8, p. 379-383, 1975.
- KUTTY, K.M.; REDHEENDRAN, R. e MURPHY, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. **Experientia**, v. 33, p. 420-421, 1977.
- KUTTY, K.M. Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.**, v. 13, p. 239-43, 1980.
- KUTTY, K.M.; HUANG, S.N. e KEAN, K.T. Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. **Experientia**, v. 37, p. 1141-1142, 1981.

- LAHIRI, D.K. e NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.
- LANDER, E.S.; SCHORK, N.J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, v. 265, p. 2037-2048, 1994.
- LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C.A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Co-amplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4715-4717, 1989.
- LAST, A.T. e GREENFIELD, S.A. Acetylcholinesterase has a non-cholinergic neuromodulatory action in the guinea-pig substantia nigra. **Exp. Brain. Res.**, v. 67, p. 445-448, 1987.
- LAUER, M.S.; ANDERSON, K.M.; KANNEL, W.B.; LEVY, D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. **JAMA**, v. 266, p. 231-236, 1991.
- LAWRENCE, S.H. e MELNICK, P.J. Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, imuno-electrophoretic and quantitative studies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 107, p. 998-1001, 1961.
- LAYER, P.G. e SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 284-288, 1987.
- LAYER, P.G. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. **Bioessays**, v. 12, n. 9, p. 415-420, 1990.
- LAYER, P.G.; WEILCERT, T.; e WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. **Cell Tissue Res.**, v. 268, p. 409-418, 1992.

- LEHMANN A.B. e BASEY, E.J. Longitudinal weight changes over four years and associated health factors in 629 men and women aged over 65. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 50, p. 6-11, 1996.
- LEPIENSKI, L.M. **Variante K da butirilcolinesterase e diabetes mellitus**. Curitiba, 2004. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- LEVANO, S.; GINZ, H.; SIEGEMUND, M.; FILIPOVIC, M.; VORONKOV, E.; URWYLER, A. e GIRARD, T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. **Anesthesiology**, v. 102, p. 531-535, 2005.
- LIDDELL, J.; LEHMANN, H. e SILK, E. A silent pseudocholinesterase gene. **Nature, Lond.**, v. 193, p. 561-62, 1962.
- LIU, W.; CHENG, J.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H. e HADA, T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 193-199, 2002.
- LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 8324-30, 1979.
- LOCKRIDGE, O. Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. **J. Neurochem.**, v. 39, p. 106-110, 1982.
- LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12012-18, 1982.
- LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E. e JOHNSON, L.L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 549-557, 1987a.

- LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S. e LA DU, B.N. Location of disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262 (27), p. 12945-12952, 1987b.
- LU, D.; WILLARD, D.; PATEL, I.R.; KADWELL, S.; OVERTON, L.; KOST, T.; LUTHER, M.; CHEN, W.; WOYCHIK, R.P.; WILKISON, W.O. e CONE, R.D. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. **Nature**, v. 371, p. 799–802, 1994.
- MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. e ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. **Clin. Chim. Acta.**, v. 235, p. 41-57, 1995.
- MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J. e IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 924-9, 1997.
- MAES, H.H.; NEALE, M.C.; EAVES, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. **Behav. Genet.**, v. 27, p. 325-351, 1997.
- MAGARIAN, E.O. e DIETZ, A.J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 27, p. 819-820, 1987.
- MARINISSEN M.J.; CHIARIELLO, M. e GUTKIND, J.S. Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 γ) MAP kinase pathway. **Genes Dev.**, v. 15, p. 535-553, 2001.
- MARTIN, M.E.; YANG, X.Y. e FOLK, W.R. Expression of a 91-Kilodalton PEA3-Binding Protein Is Down-Regulated during Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, p. 2213-2221, 1992.
- MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 988, p. 258-266, 1989.
- MASSON, P. **Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology.**

- Massoulié J. et al. eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.
- MASSON, P; XIE, W; FROMENT, M.T e LOCKRIDGE, O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the 6 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1544, p. 166-176, 2001.
- MATTEVI, V.S.; ZEMBRZUSKI, V.M. e HUTZ, M.H. A resistin gene polymorphism is associated with body mass index in women. **Hum. Genet.**, v. 115, p. 208-212, 2004.
- MATTEVI, V.S.; ZEMBRZUSKI, V.M. e HUTZ, M.H. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 26, p. 1179-1185, 2002.
- MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 953-57, 1989.
- MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSEN, E.G.; e LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-39, 2002.
- MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene BCHE e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase.** Curitiba, 2005. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- MIKHAILOV, A.; SHINOHARA, M. e RIEDER, C.L. Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. **J. Cell Biol.**, v. 166, p. 517-526, 2004.
- MILLARD, C.B. e BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

- MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J. e HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 11315-19, 1991.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NC_000003&from=166973395&to=167037952&strand=2&dopt=gb . Acessado em 11/05/2005.
- NAKABEPPU, Y.; RYDER, K. e NATHANS D. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. **Cell.**, v. 55, p. 907-915, 1988.
- NEEL, J.V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 353–362, 1962.
- NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P. e FONTECILLA-CAMPS, J.C. Crystal structure of butyrylcholinesterase and of its complexes with substrates and products. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 41141-41147, 2003.
- NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C.; GRAESER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT->GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, v. 46, p. 934-42, 1990.
- NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F. e MCGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 821-8, 1992.
- NOUSIAINEN, U. e RYHÄNEN, R. Serum lipids and hepatic microsomal enzymes with special reference to serum cholinesterase in Wistar rats. **Gen. Pharmacol.**, v. 15, p. 123-127, 1984.
- NOVAK, E.M. e BYDLOWSKI, S.P. Biologia Molecular das dislipidemias. Variação Genética das apolipoproteínas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 67, p. 411-417, 1996.

- ÖHMAN, M. **The search for genes predisposing to obesity**. Tese de Doutorado. Department of Molecular Medicine, National Public Health Institute and Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Finland, 2001.
- OLINIC, D.; STOIA, M.; MARIAN, I.; TRIF, I. e CUCUIANU, M. Apolipoproteins A1 and B levels and serum cholinesterase activity in hyperlipidemic subjects. **Rom. Intern. Med.**, v. 37, p. 71-79, 1999.
- ORESKOVIC, K. e KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 78, p. 117-120, 1992.
- PATINKIN, D.; SEIDMAN, S.; ECKSTEIN, F.; BENSELER, F.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Manipulations of cholinesterase gene expression modulates murine megakaryocytopoiesis in vitro. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 6046-6050, 1990.
- PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, p. 540-543, 1995.
- PERUSSE, L.; RANKINEN, T.; ZUBERI, A.; CHAGNON, Y.C.; WEISNAGEL, S.J.; ARGYROPOULOS, G.; WALTS, B.; SNYDER, E.E. e BOUCHARD C. The Human Obesity Gene Map: The 2004 Update. **Obes. Res.**, v. 13, p. 381-490, 2004.
- PIC, L.C. Novel pharmacological approaches for the antagonism of neuromuscular blockade. **AANA J.** v. 73, p. 37-40, 2005.
- PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C.; PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. e VIEIRA, M.M. An Improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. **Biochem. Genet.**, v. 32, p. 83-89, 1994.
- POPKIN, B. The shift in stages of the nutrition transition in the developing world differs from past experiences! **Public Health Nutrition**, v. 5, p. 205–214, 2002.
- POPOVIC, L.; ORESKOVIC, K.; ZUPANCIC, B.; PETRUNIC, M. e KUNEC-VAJIC, E. The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism. **Metab. Res.**, v. 3, p. 137-140, 1998.

- PRIMO-PARMO, S.L. **Caracterização de nove alelos silenciosos novos da butirilcolinesterase humana a nível de ADN**. Curitiba, 1993. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W. e LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, p. 52-64, 1996.
- PRIMO-PARMO, S.L.; LIGHTSTONE, H. e LA DU B.N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, v. 7, p. 27-34, 1997.
- PRITCHARD, D.; BROWN, A. e TOUTANT, J-P. The molecular forms of acetylcholinesterase from *Neceur americanus* (Nematoda), a hookworm parasite of the human intestine . **Eur. J. Biochem.**, v. 219, p. 317-323, 1994.
- PUHAIKAINEN, E.; RYKÄNEN, R. e PENTTILÄ, I. Serum pseudocholinesterase and HDL-cholesterol. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 18, p. 684, 1980.
- RAO, R.V.; GNANAMUTHU, C. e BALASUBRAMANIAN, A.S. Human cerebrospinal fluid acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Evidence for identity between the serum and cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase. **Clin. Chim. Acta**, v. 183, p. 135-146, 1989.
- ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 50, p. 745-52, 1957.
- ROBITZKI, A.; MACK, A.; HOPPE, U.; CHATONNET, A. e LAYER, P.G. Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reaggregates of the chick embryo. **J. Neurochem.**, v. 71, p. 413-420, 1998.
- ROSMOND, R. Aetiology of obesity: a striving after wind? **Obes. Res.**, v. 5, p. 177-181, 2004.
- ROSNER, M.H.; VIGANO, M.A.; OZATO, K.; TIMMONS, P.M.; POIRIER, F.; RIGBY, P.W. e STAUDT, L.M. A POU-domain transcription factor in early stem cells and

- germ cells of the mammalian embryo. **Nature**, v. 345, p. 686-692, 1990.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A. e LUBRANO, T. E1^K, another quantitative variant at cholinesterase locus1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.
- RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J. e VIDAL, C.J. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 72, p. 11-22, 2002.
- RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; MUNOZ-DELGADO, E. e VIDAL, C.J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 80, p. 105-114, 2003.
- RYHÄNEN, R.J.J.; JAUHIANEN, M.S.; LAITINEN, M.V. e PUHAKAINEN, E.V. The relationships between human serum pseudocholinesterase, lipoproteins and apolipoproteins (APOHDL). **Biochem. Med.**, v. 28, p. 241-245, 1982.
- RYHÄNEN, R.J.J.; HERRANEN, J.; KORHONEN, K.; PENTTILÄ, I.; POLVILAMPI, M. e PUHAKAINEN, E. Relationship between serum lipids, lipoproteins and pseudocholinesterase during organophosphate poisoning in rabbits. **Int. J. Biochem.**, v. 16, p. 687-690, 1984.
- SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJISAWA, T.; MAEDA, M. e IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of a familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta.**, v. 274, p. 159-66, 1998.
- SAVAGE, D.B.; AGOSTINI, M.; BARROSO, I.; GURNELL, M.; LUAN, J.; MEIRHAEGHE, A.; HARDING, A.H.; IHRKE, G.; RAJANAYAGAM, O.; SOOS, M.A.; GEORGE, S.; BERGER, D.; THOMAS, E.L.; BELL, J.D.; MEERAN, K.; ROSS, R.J.; VIDAL-PUIG, A.; WAREHAM, N.J.; O'RAHILLY, S.; CHATTERJEE, V.K.; SCHAFER, A.J. Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree. **Nat. Genet.**, v. 31, p. 379-384, 2002.

- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. e EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- SCHOLER, H.R.; BALLING, R.; HATZOPOULOS, A.K.; SUZUKI, N. e GRUSS, P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. **EMBO J.** v. 8, p.2551-2557, 1989.
- SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, V.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMANN, T., e TAYLOR, P. Primary structure of *Torpedo Californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature (London)**, v. 319, p. 407-409, 1986.
- SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 26, p. 189-94, 1974.
- SHIBUTA, K.; ABE, M. e SUZUKI, T. A new detection method for the K variant of the butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). **J. Med. Genet.**, v.34, p. 576-79, 1994.
- SHNIDER, S.M. Serum cholinesterase activity during pregnancy, labor and the puerperium. **Anesthesiology**, v. 26, p. 335-339, 1965.
- SIDELL, F.R. e KAMINSKIS, A. Influence of age, sex and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. **Clin. Chem.**, v. 21, p. 1393-1395, 1975.
- SMALE, S.T.; SCHMIDT M.C.; BERK A.J. e BALTIMORE D. Transcriptional activation by SpI as directed through TATA or initiator: Specific requirement for mammalian transcription factor HID. **Biochemistry**, v. 87, p. 4509-4513, 1990.
- SMALL, D.H.; ISMAEL, Z.; e CHUBB, I. W. Acetylcholinesterase exhibits trypsin-like and metallo exopeptidase-like activity in cleaving a model peptide. **Neuroscience**, v. 21, p. 991-995, 1987.

- SNYDER, E.E.; WALTZ, B.; PE'USSE, L.; CHAGNON, Y.C.; WEISNAGEL, J.S.; RANKINEN, T. e BOUCHARD, C. The Human Obesity Gene Map: The 2003 Update. **Obes. Res.**, v. 12, p. 369-439, 2004.
- SOREQ, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y. e ZAKUT H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, v. 3, p. 511-516, 1991.
- SOUZA, R.L.R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese.** Curitiba, 1995. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; FREUND, A.A.; CULPI, L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. **Hum. Biol.**, v. 70, p. 965-70, 1998.
- SOUZA, R.L.R.; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K.V.; FURTADO, L e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Ant.**, v. 326, p. 329-334, 2005a.
- SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, p. 349-353, 2005b.
- STEWART, D.J.; INABA, T.; TANG, B.K.; e KALOW, W. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. **Life Sci.**, v. 20, p. 1557-1564, 1977.
- STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L. e CARRENHO, J.M.X. Studies on the CHE1 locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Southern Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 8, p. 535-543, 1985.
- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T. e KANNO, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 165-69, 1996.
- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H. e TANAKA, T.

- Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 240, p. 372-75, 1997.
- SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.**, v. 33, p. 321-27, 1986.
- SUN, H.; YAZAL, J.E.; LOCKRIDGE, O.; SCHOPFER, L.M.; BRIMIJOIN, S. e PANG, Y-P. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butyrylcholinesterase. Engineering effective butyrylcholinesterase mutants for cocaine detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9330-9336, 2001.
- SUN, H.; PANG, Y-P.; LOCKRIDGE, O. e BRIMIJOIN, S. Re-engineering butyrylcholinesterase as a cocaine hydrolase. **Mol. Pharmacol.**, v. 62, p. 220-224, 2002.
- TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.; MUIR, G.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOLF, E.A.; MONROE, C.A.; TEPPER, R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263-1271, 1995.
- TARTAGLIA, L.A.; TEPPER, R.I. A thin commentary on a fat receptor. **Cell**, v. 116 (2 Suppl), p. 121-122, 2004.
- TSCHÖP, M.; WEYER, C.; TATARANNI, A.P.; DEVANARAYAN, V.; RAVUSSIN, E. E HEIMAN, M.L. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. **Diabetes**, v. 50, p. 707-709, 2000.
- TSCHÖP, M.; SMILEY, D.L. e HELMAN, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, p. 908-913, 2001.
- TOUTANT, J-P. Insect acetylcholinesterase : catalytic properties, tissue distribution and molecular forms . **Prog . Neurobiol.**, v. 32, p. 423-446, 1989.

- TUTOR-CRESPO, M.J.; HERMIDA, J. E TUTOR, J.C. Possible induction of cholinesterase in epileptic patients treated with anticonvulsiant drugs: relationship with lipoproteins levels. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 44, p. 974-980, 2004.
- UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E.E.; CHAGNON, M.; SJOSTROM, L. e BOUCHARD, C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 86, p. 3996-3999, 2001.
- VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C₅ variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₅ variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, v. 53, p. 633-44, 1973.
- WAALER, H.T. Hazard of obesity - the Norwegian experience. **Acta Med. Scand. Suppl.**, v. 723, p. 17-21, 1998.
- WADE, T.D.; BULIK, C.M.; HEATH, A.C.; MARTIN, N.G.; e EAVES, L.J. The Influence of Genetic and Environmental Factors in Estimations of Current Body Size, Desired Body Size, and Body Dissatisfaction. **Twin Res.**, Agosto, 2001.
- WASYLYK, B.; WASYLYK, C.; FLORES, P.; BEGUE, A.; LEPRINCE, D. e STEHELIN, D. The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. **Nature**, v. 346, p. 191-193, 1990.
- WEBB, C.P. e GREENFIELD, S.A. Non-cholinergic effects of acetylcholinesterase in the substantia nigra: a possible role for an ATP sensitive potassium channel. **Exp. Brain Res.**, v. 89, p. 49-58, 1992.
- WEITNAUER, E.; ROBITZKI A. e LAYER, P.G. Aryl acylamidase activity exhibited by butyrylcholinesterase is higher in chick than in horse, but much lower than in fetal calf serum. **Neurosci. Lett.**, v. 254, p.153-156, 1998.
- WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F. e LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-51, 1947.

- WHITE, D.W.; ZHOU, J.; STRICKER-KRONRAD, A.; GE, P.; MORGENSTERN, J.P.; DEMBSKI, M.; TARTAGLIA, L.A. Identification of leptin-induced transcripts in the mouse hypothalamus. **Diabetes**, v. 49, p. 1443-1450, 2000.
- WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v. 35, p. 174-97, 1980.
- WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. Karger, Basel, New York., p. 1-126, 1986.
- WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Eh₁, a new allele at cholinesterase locus 1. **Hum. Hered.**, v. 37, p. 54-58, 1987.
- WILLBOLD, E. e LAYER, P.G. A hidden retinal regenerative capacity from the chick diary margin is reactivated in vitro, that is accompanied by down-regulation of butyrylcholinesterase. **Eur. J. Neurosci.**, v. 4, p. 210-220, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WESTERN PACIFIC REGION. **The Asia-Pacific perspective: redefining obesity and its treatment**. Published by Health Communications Australia on behalf of the Steering Comitee, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, Nutrition And The Prevention Of Chronic Diseases**. WHO. Technical Reports Series n. 916. World Health Organization Expert Committee, Geneva, 2003.
- XIE, W.; ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.F.; SPEIRS, R.J.; CASHMAN, R.J. e LOCKRIDGE, O. An improved cocaine hydrolase: the A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p. 83-91, 1999.
- YEN, T.; NIGHTINGALE, B.N.; BURNS, J.C.; SULLIVAN, D.R. e STEWART, P.M. Butyrylcholinesterase (BCHE) Genotyping for Post-Succinylcholine Apnea in an Australian Population. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1297-1308, 2003.
- ZAKUT, H.; ERLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SELDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R e SOREQ, H. Acetylcholinesterase and

butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 900-908, 1990.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M.
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.